

М. П. ШЕРСТНЕВ О. С. КОМАРОВ

Химия и биология нуклеиновых кислот

МИР ЗНАНИЙ

М.П. ШЕРСТНЕВ О.С. КОМАРОВ

Химия и биология нуклеиновых кислот

Книга для учащихся 10—11 классов средней школы

МОСКВА «ПРОСВЕЩЕНИЕ» 1990

ББК 28.072
Ш5

Рецензенты:
доктор химических наук **А. Н. Шамин**, учитель химии **К. Е. Домео**

Шерстнев М. П., Комаров О. С.
Ш50 Химия и биология нуклеиновых кислот: Кн. для учащихся 10—11 кл. сред. шк. — М.: Просвещение, 1990. — 160 с., 8 л. ил.: ил. — (Мир знаний). — ISBN 5-09-001421-3

В книге, предназначенной для учащихся старших классов, подробно рассматриваются строение и синтез нуклеиновых кислот, их основные свойства, роль в организме. Большое внимание уделено истории и методам исследования нуклеиновых кислот. Основываясь на материале школьной программы, книга будет способствовать развитию интереса школьников к новому предмету.

Ш $\frac{4306020000—242}{103(03)—90}$ 272—90 ББК 28.072

ISBN 5-09-001421-3

Введение

Биоорганическая химия — наука сравнительно молодая, но она уже успела занять важное место среди других отраслей знания, поскольку имеет ярко выраженную практическую направленность.

Основным предметом изучения биоорганической химии являются «молекулы жизни», в том числе нуклеиновые кислоты, которым посвящена эта книга. Во многих областях химии, биологии, сельского хозяйства и медицины понятие «нуклеиновые кислоты» является основополагающим. С ними связаны все проявления свойств живого: размножение и развитие организмов, белковый и липидный обмены.

Открытие нуклеиновых кислот произвело настоящий переворот в представлениях о сущности жизни, о путях управления процессами обмена, о наследственной организации растений, животных и человека. Появилась возможность изучения эволюции на молекулярном уровне, что позволило осознать прошлое и оценить будущее живых организмов, в том числе и человека.

Изучение нуклеиновых кислот имеет не только большое познавательное значение. Оно является инструментом, с помощью которого можно изменить природу, проникнуть в ее самые сокровенные тайны. Знания о нуклеиновых кислотах помогают ученым решать проблемы плодородия, развития новых технологических процессов, предупреждения и лечения заболеваний.

Селекция, гибридизация, отбор — эти давно знакомые нам понятия получили развитие благодаря внедрению научных методов в практику. Исследования нуклеиновых кислот в организме способствовали выведению новых сортов пшеницы, овощей, фруктов, новых пород

скота, позволили повысить урожайность растений и производительность животных.

В настоящее время разработаны принципиально новые биотехнологические процессы для получения различных биохимических соединений, используемых в медицине, сельском хозяйстве и промышленности.

В этой книге вы найдете много интересного об истории открытия и исследования нуклеиновых кислот. Вас, несомненно, заинтересуют имена ученых, посвятивших свою жизнь изучению этих веществ. Более подробные сведения о них можно получить в именном указателе в конце книги.

В разных областях знаний, как и в разных странах, существуют свои языки. Научный язык включает специальные термины, сокращения и аббревиатуры. Пусть вас не пугают новые понятия, с которыми вы встретитесь на страницах этой книги. Обратитесь к словарю терминов и сокращений: он станет ключом, позволяющим открыть дверь в новый для вас мир нуклеиновых кислот.

Большинство названий ферментов по тривиальной номенклатуре в тексте можно определить по окончанию «-аза»: лигаза, дезоксирибонуклеаза, рибонуклеаза. Исключение составляют трипсин, лизоцим. Согласно систематической номенклатуре название фермента состоит из двух частей: первая часть представляет собой название субстрата, вторая с окончанием «-аза» указывает на катализируемую ферментом реакцию. Например, мочевина-аминогидролаза. Тривиальное название этого фермента «уреаза». Большинство углеводов при написании имеет окончание «-оза», например глюкоза, фруктоза, рибоза, дезоксирибоза, сахароза, целлюлоза. Исключение составляет крахмал.

Следует обратить внимание на иллюстрации. Помимо забавных рисунков и нескольких схем, в конце книги находятся цветные таблицы, обозначенные в тексте римскими цифрами. Они помогут вам лучше понять суть биохимических процессов.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Аллель — один из нескольких вариантов гена, которые могут находиться в данном локусе хромосомы.

Антиген — чуждое для организма вещество, вызывающее образование в организме антител.

Антитело — молекула белка группы иммуноглобулинов, образующаяся в организме человека и теплокровных животных при попадании в него антигенов и нейтрализующая их вредное действие.

Аутосома — обычная хромосома ядра клетки организма, не относящаяся к половым хромосомам.

Гистология — наука о тканях многоклеточных животных и человека, которая изучает развитие, строение и функционирование тканей в норме.

Гистохимические реакции — реакции, протекающие при изучении химических свойств тканей. В основном это реакции, связанные с окраской срезов тканей.

Гликозидный углерод — атом углерода, входящий в структуру гликозида.

Гормон — продукт желез внутренней секреции, выделяемый непосредственно в кровь. Гормоны являются физиологически активными веществами и активно участвуют в регуляции функций организма.

Индуцирование — процесс, приводящий в действие какие-либо реакции, явления.

Катализ — повышение скорости химических и биохимических реакций за счет добавки небольших количеств определенных веществ — катализаторов.

Конформационная характеристика — характеристика расположения частей молекулы в пространстве.

Корреляция — термин, используемый в математической статистике, которым обозначают связь между

явлениями, одно из которых может быть причиной другого или, если имеются общие причины, воздействующие на изучаемые явления.

Кроссинговер (перекрест) — взаимный обмен частями между парными (гомологичными) хромосомами, в результате которого образуются новые комбинации генов, т. е. происходит рекомбинация генов.

Кофермент — органическое вещество небелковой природы, составляющее вместе с белковой частью (апоферментом) молекулу фермента. Кофермент более устойчив к температурным воздействиям, чем белок.

Лабильность — изменчивость, неустойчивость.

Липопротеидный комплекс — соединение в целое липидов и белков в крови с образованием сферических частиц.

Мезосома — особое выпячивание цитоплазматической мембраны бактериальной клетки, соединенное с молекулой хромосомной ДНК. Мезосома представляет собой закрученное в плоскую спираль или напоминающее клубок трубчатое мембранное образование.

Репликация — создание себе подобной структуры, в частности синтез каждой из нитей молекулы ДНК парной ей нити. Репликация лежит в основе передачи наследственной информации от клетке к клетке.

Серповидно-клеточная анемия — заболевание, характеризующееся врожденной неполноценностью эритроцитов, связанной с наличием в белковой части молекулы гемоглобина до 60—90 % патологического гемоглобина — аномального гемоглобина *S* в отличие от нормального гемоглобина А. Развивается у детей-гомозиготов. Дети-гетерозиготы являются носителями серповидно-клеточной анемии.

Сложноэфирная связь — связь $—C(=O)—O—$, соединяющая два углеводородных радикала.

Транскрипция — биосинтез РНК на матрице ДНК, осуществляющийся в процессе передачи наследственной информации внутри клетки.

Трансляция — биосинтез полипептидных цепей белков, осуществляющийся путем считывания генетической информации, записанной в виде последовательности нуклеотидов в молекулах *и*РНК.

Трансформация — изменение наследственных свойств клетки в результате внесения в нее генетического материала (ДНК, хромосом, генов) других клеток.

Фенилкетонурия — наследственное заболевание, обусловленное нарушением обмена фенилаланина, характеризующееся прогрессирующим слабоумием. В основе биохимических нарушений лежит отсутствие вырабатываемого печенью фермента фенилаланин-4-гидроксилазы, что приводит к блокированию превращения фенилаланина в тирозин.

Фермент — вещество белковой природы; ферменты присутствуют во всех живых клетках животных, растений и микроорганизмов. Ферменты направляют, регулируют и ускоряют биохимические реакции в клетках.

Хромомеры — более толстые и интенсивно окрашенные участки хромосомы, чередующиеся с межхромомерными нитями. Предполагается, что хромомер является единицей генетической функции.

Экспрессия — степень фенотипического проявления гена, т. е. степень выраженности того или иного признака, кодируемого данным геном.

Эукариоты — все высшие организмы, клетки которых содержат оформленное ядро, отделенное от цитоплазмы оболочкой в виде мембраны. Эукариоты осуществляют деление как по типу митоза, так и по типу мейоза.

Глава 1

ИЗ ИСТОРИИ ИЗУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Открытие нуклеиновых кислот принадлежит швейцарскому химику *Ф. Мишеру*, который продолжительное время изучал ядра лейкоцитов, входящих в состав гноя. Кропотливая работа замечательного исследователя увенчалась успехом.

В 1869 г. Ф. Мишер обнаружил в лейкоцитах новое химическое соединение, которое назвал нуклеином (лат. nucleus — ядро). Дальнейшие исследования показали, что нуклеин представляет собой смесь нуклеиновых кислот.

Впоследствии нуклеиновые кислоты были обнаружены во всех растительных и животных клетках, бактериях и вирусах. Однако химическое строение нуклеиновых кислот и их основных компонентов устанавливалось с трудом.

В природе существуют два вида нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая и рибонуклеиновая. Различие в названиях объясняется тем, что молекула ДНК содержит сахар дезоксирибозу, а молекула РНК — рибозу. В настоящее время известно большое число разновидностей ДНК и РНК, отличающихся друг от друга по строению и значению в обмене веществ (метаболизме).

С момента открытия Ф. Мишером нуклеиновых кислот до установления их точной структуры прошло почти столетие, но за такой, казалось бы, огромный срок в расшифровке состава и структуры нуклеиновых кислот было сделано немного. Основная причина медленного развития знаний — несовершенство средств исследования, которые имелись в распоряжении физиков, биологов и биохимиков в те времена. Окончательное пред-

ставление о структуре ДНК сформировалось только в начале 50-х годов XX столетия.

Тем не менее с момента открытия нуклеиновых кислот ученые разных стран интенсивно изучали строение и свойства этого биоорганического соединения. Был накоплен огромный фактический материал, послуживший основой как для последующего исследования нуклеиновых кислот, так и для практического применения результатов, полученных при их изучении.

В 1909 г. в результате гидролиза нуклеиновых кислот были выделены входящие в их состав сахара: рибоза и дезоксирибоза.

Расшифровку структуры мононуклеотидов следует отнести к 20-м годам, когда в результате продолжительной работы была раскрыта их структурная формула и было показано, что они являются основными составляющими единицами, из которых построены нуклеиновые кислоты. В последующем эти данные были использованы при расшифровке структуры молекулы ДНК в целом, а также для понимания механизма репродукции ДНК.

В 1936 г. советский ученый-химик *А. Н. Белозерский* впервые обнаружил ДНК в клетках растений. Это открытие имело принципиальное значение — ДНК стали рассматривать как универсальный биологический материал.

В период с **1900** по **1930 г.** проводятся работы по созданию хромосомной теории наследственности, в основу которой положены данные о том, что материальная структура — гены ДНК — содержат генетическую информацию. Основоположником этой теории является *Томас Морган*. Именно ему принадлежит приоритет в применении нового биологического объекта, который в настоящее время повсеместно используется при проведении практически всех генетических исследований.

С 1909 г. Т. Морган начал использовать плодовую мушку дрозофилу как объект для изучения изменения наследственных признаков и их комбинаций. Т. Морган совместно с *К. Бриджисом, Г. Меллером* и *А. Стертевантом* разработал и экспериментально обосновал существовавшее в неявном виде представление о генах — элементарных единицах наследственности и изменчивости. По имени создателя теория получила название концепции морганизма, согласно которой единицы наследственности имеют материальную природу

с конкретной локализацией в хромосомах ядра клеток всех живых организмов. Морганизм является теоретической основой хромосомной теории наследственности.

В 1901 г. вышла в свет книга *Г. де Фриза* «Мутационная теория», в которой была дана интерпретация термина «мутация». Книга получила широкую известность, а вместе с ней в жизнь вошел и термин «мутация», хотя непосредственная связь его с ДНК была окончательно установлена гораздо позже. Этот термин стали применять для обозначения внезапного изменения генетической информации.

Введение в обиход научных представлений о мутациях оказало большое влияние на дальнейшее развитие знаний о нуклеиновых кислотах. В самом деле, если происходит резкое изменение генетической информации, обнаруживающееся в появлении или исчезновении какого-либо признака, то это должно быть следствием двух событий: во-первых, существует какой-то материальный носитель этой генетической информации и, во-вторых, эта информация должна меняться дискретно, т. е. порциями, соответствующими каким-то блокам, используемым для ее кодирования.

В 1921 г. *С. Райт* ввел понятие «давление мутаций», которым обозначается устойчивость массового процесса мутирования. Этим понятием описывается возникновение какого-либо признака и развитие его в процессе естественной жизни популяций организмов.

С развитием исследований, связанных с изучением мутаций, появились многочисленные методы количественного и качественного определения мутаций. Качественные методы исследования позволяют оценить эффект воздействия: вызывает оно мутации или нет. Количественные методы позволяют оценивать частоту возникновения мутаций. Одновременно стало складываться представление об аллелях — существовании каждого гена, по крайней мере, в двух формах. Один из аллелей происходит от материнского организма, другой от отцовского.

Отечественные ученые также внесли свой вклад в развитие концепции материальной природы наследственности.

В 1925 г. *Г. А. Надсон* и *Т. С. Филиппов* открыли влияние рентгеновских лучей на появление наследственных изменений в эксперименте и обосновали формирование физиологических и биохимических подходов в

трактовке понятия гена. Рентгеновское излучение было использовано для ускорения мутационного процесса.

В конце 20-х — начале 30-х годов Н. П. Дубинин, А. С. Серебровский с сотрудниками, используя данные Г. А. Надсона и Т. С. Филиппова и результаты собственных экспериментов, доказали сложное строение гена.

Было опровергнуто мнение о том, что первым и главным «претендентом» на роль гена является белок. Химия дала новый импульс к исследованиям в биологии и генетике. Генетические соображения играли относительно малую роль в исследовании нуклеиновых кислот вплоть до работ О. Эйвери.

Каково же реальное значение открытия нуклеиновых кислот? Какой вклад в науку и мировоззрение людей внесли полученные результаты исследований, связанные с установлением фактов локализации наследственной информации в нуклеиновых кислотах?

Нуклеиновые кислоты являются реально существующим субстратом, который хранит, передает по наследству и воспроизводит все многообразие свойств и характеристик живых организмов. С их открытием развеялся миф об идеалистической сущности передачи наследственной информации. Было найдено конкретное химическое вещество, которое можно «потрогать руками», вещество, несущее генетическую информацию. Это открытие в значительной степени стимулировало практическое использование биологических знаний, в частности для изучения наследственных заболеваний.

В 1908 г. *А. Гаррод* впервые проследил на практике связь между материальным носителем наследственной информации — нуклеиновой кислотой, являющейся структурной основой гена, и ферментом, кодируемым этим геном. Впервые был показан путь к изучению молекулярных основ наследственных заболеваний. Был снят мистический покров с доселе загадочного явления передачи патологических признаков от родителей потомству. Конечно, А. Гаррод знал о существовании нуклеиновых кислот и о том, что они находятся в ядре клетки, но в своем открытии он руководствовался собственными наблюдениями, статистическими исследованиями, а не имеющейся в то время скудной информацией о нуклеиновых кислотах, которые были чрезвычайно мало изучены. На основании своих наблюдений и клинического материала, накопленного к тому времени другими учеными, А. Гаррод сформулировал концепцию

о врожденных болезнях, связанных с нарушением обмена веществ.

В период с конца 20-х до начала 50-х годов были открыты новые факты, связанные со структурой и функцией нуклеиновых кислот. Утвердилась хромосомная теория наследственности, основанная на научных сведениях о нуклеиновых кислотах.

В 1926 г. *А. Стертевант* ввел в употребление понятие инверсии. В генетических исследованиях оно имеет большое значение. Он обнаружил это явление при изучении кроссинговера у самок плодовой мушки дрозофилы. При этом А. Стертевант обнаружил, что срединный участок одной из хромосом третьей пары перевернут на 180°, т. е. поставлен в обратном направлении. Вот этот переворот участка хромосомы и стали называть инверсией. Инверсии бывают простые (одиночные) и сложные. Причем сложные инверсии ведут к весьма значительным перестановкам блоков генов.

В 1928 г. советский биолог *Н. К. Кольцов* намного опережая открытие Д. Уотсона и Ф. Крика, в ясной форме высказал предположение о матричном синтезе, т. е. о том, что в настоящее время понимают под механизмом репликации и транскрипции.

В 1930—1933 гг. *Д. Костов* и *Т. Пейнтер* показали, что разные участки хромосомы окрашиваются неодинаково. Это дало возможность непосредственно наблюдать за изменением генетической информации в хромосомах с помощью микроскопа, в частности за протеканием хромосомных мутаций. Методы исследования хромосомных мутаций помогли окончательно закрепить материалистические позиции теории наследственности и изменчивости. Было установлено, что хромосома построена из хроматиновых нитей, хорошо окрашиваемых различными красителями.

Исследования, проведенные в связи с открытием нуклеиновых кислот, многочисленные работы генетиков и биологов по изучению механизма наследственности и изменчивости признаков, привлекли к этой проблеме внимание общественности.

В работах по исследованию нуклеиновых кислот, как, впрочем, и при развитии любого нового направления науки, были ошибки и заблуждения.

В 1935 г. группа ученых под руководством *Х. Лемана* обнаружила, что нуклеиновые кислоты и нуклеопротеины (нуклеиновые кислоты в сочетании с окружающими

их белками) обладают способностью индуцировать размножение и дифференцировку клеток. Причем, как было показано в последующие годы, такой активностью обладают любые нуклеопротеины, независимо от источника их происхождения. Открытие индуцирующей активности нуклеопротеинов надолго привлекло внимание исследователей к изучению нуклеиновых кислот, в частности, к изучению РНК. Однако в последующем оказалось, что эффект препаратов скорее связан с белковой составляющей, чем с РНК.

В 1950—1953 гг. *Э. Чаргафф* с сотрудниками опубликовал сенсационную серию работ, по изучению химической структуры нуклеиновых кислот. Они обследовали огромное количество разных организмов, брали образцы из различных органов и тканей. Проведенные исследования показали, что в состав ДНК, выделенной из ядер клеток человека, входят 30 % аденина, 20 % гуанина, 20 % цитозина, 30 % тимина. В то же время у бактерий например *Sarcina lutea,* эти цифры значительно отличаются и составляют соответственно 13 %, 37 %, 37 %, и 13 %. Эти и другие наблюдения позволили сделать вывод, что в состав ДНК разных организмов входит неодинаковое количество азотистых оснований. Но для одного и того же организма соотношение между нуклеотидами сохраняется постоянным, из каких бы клеток ни выделяли ДНК. Это значит, что во всех клетках, например, человека, ядерная ДНК будет содержать 30 % аденина. И какой бы штамм бактерий *Sarcina lutea* ни был взят, в какие сроки и в каких бы то ни было условиях ни проводились эксперименты, содержание в них аденина будет всегда равным 13 %, тимина — 13 % и т. д.

Итак, общее количество адениновых остатков в каждой молекуле ДНК равно количеству тиминовых остатков, а количество гуаниновых единиц — количеству цитозиновых. В дальнейшем этим открытием, получившим название «правило Чаргаффа» воспользовались *Дж. Уотсон* и *Ф. Крик* при построении моделей молекулы ДНК. На основании проведенных исследований было высказано предположение, что такая закономерность обусловлена наличием генетического кода, заключенного в структуре ДНК.

В этот же период было сделано еще одно уникальное открытие, указавшее на важную роль нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации. Брали

клетки совершенно различных, удаленных друг от друга органов и тканей. Исследования показали, что ядро любой клетки содержит примерно $6 \cdot 10^{-9}$ мг ДНК. Только в яйцеклетках и сперматозоидах содержание ДНК было в два раза меньше, чем в клетках остальных тканей.

Такое открытие вызвало два предположения. Во-первых, оно говорило об универсальных свойствах ДНК в пределах одного организма, о том, что в отношении хранения и передачи наследственной информации, заключенной в ядре клетки, все клетки организма равны, независимо от того, откуда они были взяты. Во-вторых, в любом организме имеется два типа клеток: соматические клетки — клетки тела организма (в переводе с греч. «сома» — *тело*) и половые клетки — клетки, связанные с размножением организмов. Между соматическими и половыми клетками существует отличие, которое проявляется в диплоидном и гаплоидном наборе хромосом. Диплоидный — это парный набор хромосом, гаплоидный — одинарный. Именно поэтому в половых клетках находится в два раза меньше нуклеиновых кислот, чем в соматических. Таким образом, вроде бы несложные количественные исследования нуклеиновых кислот дали важную по содержанию информацию.

В 1941 г. *Д. Бидл* и *Э. Татум* установили, что каждый ген, структурной основой которого является нуклеиновая кислота, отвечает за синтез определенного фермента. Этот фермент участвует в биосинтезе какого-либо химического вещества.

Развитие теоретических знаний о наследственности, включая и представления о нуклеиновых кислотах, послужило базой для мероприятий по практическому применению знаний о наследственности.

В 1941 г. Д. Нил впервые организовал кабинет по медико-генетическому консультированию при Мичиганском университете в США. Создание учреждений медико-генетического консультирования — одно из наглядных проявлений проведения теоретических идей в непосредственную практику. Медико-генетическое консультирование — это счастливые семьи, это уменьшение числа наследственных болезней, снижение рождаемости больных с различными врожденными уродствами и патологическими состояниями. Эффективность таких консультаций во многом определяется достигнутыми знаниями о нуклеиновых кислотах.

Развитие медико-генетического консультирования привлекло к проблеме наследственных заболеваний внимание общественности и врачей. Стали выявляться различные наследственные болезни и синдромы. В связи с отставанием методов исследования нуклеиновых кислот от клинических исследований история изучения наследственных заболеваний примерно до середины 50-х годов осуществлялась на основе обследования семей. Врач, расспрашивая членов семьи, составлял генеалогическое древо родственников, на котором было видно, кто из членов семьи страдал наследственными заболеваниями. **К 1958 г.** было выявлено 412 наследственных признаков человека, т. е. признаков, обусловленных информацией, записанной в нуклеиновых кислотах.

С 1944 г., начиная с работ *О. Эвери*, шло накопление фактов, указывающих на генетическую роль именно ДНК. Эти данные послужили фундаментом при построении теории функционирования ДНК. В это время были разработаны методы трансформации бактерий, т. е. изменение свойств бактериальной клетки за счет поступления генетической информации с чужеродной ДНК. Следует отметить, что впервые явление трансформации было открыто у бактерий в **1928 г.** *Ф. Гриффитом.* В работах О. Эвери и его сотрудников живые клетки «шероховатого» штамма бактерий трансформировали в пробирке в «гладкую» форму, обладающую высокой болезнетворностью. На основании изучения этого явления **в 1944 г.** О. Эвери доказал, что трансформирующим фактором является ДНК.

В 1945 г. *Г. Калькар* экспериментально обнаружил, что существует фосфоролитический механизм расщепления нуклеозидов — структурных единиц нуклеиновых кислот.

В 1950 г. *Л. Полинг* показал, что полипептидные цепи имеют α-спиральную конфигурацию, на основании чего он высказал предположение, что и молекула ДНК, по-видимому, имеет спиральную структуру, закрепленную водородными связями. Это послужило еще одним косвенным подтверждением существовавшего предположения о винтообразной структуре ДНК. Было показано, что возможно существование нескольких различных устойчивых конфигураций последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи, одной из которых является α-спираль. Конфигурация α-спирали является одной из наиболее распространенных

структур пептидной цепи. Именно такая структура дает возможность образования водородных связей между аминокислотами, находящимися рядом на смежных витках цепи. Поэтому естественно было предположить, что аналогичный механизм свойственен и для нуклеиновых кислот, так как по протяженности и числу составных элементов — в данном случае мононуклеотидов — они вполне соответствовали полипептидным цепям.

В 1951 г. *К. Картер* выделил ферменты, гидролизующие гликозидные связи нуклеозидов. Таким образом, было показано, что существуют две системы ферментативного распада нуклеозидов: гидролитический и фосфоролитический. Этими открытиями было опровергнуто ранее существовавшее предположение, что ферментативное расщепление нуклеозидов происходит в результате прямого гидролиза их молекулы по N-гликозидным связям с образованием свободных азотистых оснований и углеводов.

Таким образом, видно, что еще задолго до открытия структуры ДНК в 1953 г. многие исследователи вели работы в этом направлении. Различными методами шло наступление на тайну механизма наследственности, и постепенно накапливалось все больше экспериментальных данных, прямо или косвенно указывающих на структуру и принцип функционирования ДНК. В данном конкретном случае проявился всеобщий закон науки: каждое открытие подготавливается многими предшествующими исследованиями, без которых невозможно сделать это открытие. Отсюда становится понятной важность изучения научных основ любой проблемы, интересующей исследователя. Только изучив то, что было сделано до него, ученый может выполнять поисковую самостоятельную работу.

Впервые представление о молекуле ДНК, как о гигантской спирали, было выдвинуто после получения экспериментальных данных *М. Уилкинсом,* который на основании проведенных рентгеноструктурных исследований указал, что молекула ДНК представляет собой закрученную нить.

В 1953 г. *Д. Уотсон* и *Ф. Крик* обосновали существование двойной спирали ДНК и впервые предложили адекватную модель молекулы ДНК, которая объяснила все факты, связанные с функционированием нуклеиновых кислот. Она показала, каким образом молекула

передает информацию и воспроизводит сама себя. По сути дела, был открыт способ записи и воспроизведения генетической информации на молекулярном уровне. Д. Уотсон и Ф. Крик сами не проводили рентгеноструктурных исследований нуклеиновых кислот, но воспользовались данными М. Уилкинса и Р. Френклин и работами Э. Чаргаффа.

Основным компонентом хромосом является ДНК. Д. Уотсон и Ф. Крик выделили два основных структурных свойства ДНК: ее двуспиральность и комплементарность, иначе говоря, соответствие друг другу цепей ДНК. От этих двух свойств зависит репликация генетического материала, т. е. возможность создания себе подобной структуры ДНК. В процессе репликации двойная спираль ДНК раскручивается и на каждой из цепей, как на матрице, строится комплементарная ей дочерняя цепь.

1953 г. считается датой рождения новой биологической науки — молекулярной биологии. Название «молекулярная биология» предложил английский ученый-кристаллограф *У. Астбери.* В свою очередь она заложила основу возникновения многих самостоятельных научных дисциплин. Так как Ф. Крик и Д. Уотсон, кроме открытия структуры ДНК, внесли большой вклад в изучение других разделов молекулярной биологии, развитие этой науки по праву связывают с их именами.

Интересно, что Ф. Крик долгое время занимался разработкой мин в Британском адмиралтействе, а с 1947 г. перешел работать в научную лабораторию. Кроме совместного открытия с Д. Уотсоном, он выдвинул еще ряд положений и концепций, связанных с исследованием нуклеиновых кислот, наиболее значительной из которых является сформулированная им в 1961 г. концепция об основных свойствах генетического кода. Д. Уотсон, американский биохимик, после окончания аспирантуры в университете штата Индиана с 1951 по 1953 гг. работал в Кавендишской лаборатории Кембриджского университета (Англия).

Открытие в 1953 г. структуры и механизма функционирования ДНК в качестве носителя наследственной информации является началом современного этапа в изучении нуклеиновых кислот. Расшифровка строения нуклеиновых кислот, понимание их функции способствовали значительному прогрессу в изучении белкового синтеза.

В 50-х годах XX в. в опытах с модельными системами было доказано, что местом синтеза белка в клетке являются рибосомы. В это же время была открыта транспортная РНК и установлена вся последовательность этапов биосинтеза белковых молекул.

В середине 50-х годов на основании исследований, проведенных в различных разделах биологии, была сформулирована концепция о том, что гены являются участками молекулы ДНК, в которых наследственная информация закодирована чередованием пар нуклеотидов. Был создан новый раздел генетики — молекулярная генетика.

В конце 50-х — начале 60-х годов группа советских ученых под руководством академика *А. С. Спирина* и зарубежные исследователи во главе с *П. Доти* разработали модель вторичной структуры РНК с так называемыми шпильками. Было установлено, что большинство природных РНК являются однонитевыми полинуклеотидами. Однако в некоторых участках РНК существуют более или менее протяженные участки комплементарных азотистых оснований. В тех случаях, когда комплементарные отрезки расположены близко друг к другу, они соединяются и образуют шпилькообразные элементы, функция которых до сих пор не совсем ясна. По своей сущности шпильки представляют собой спиральную структуру, сходную со структурой ДНК.

В 1955 г. *Г. Паладе* открыл рибосомы при электронном микроскопировании клеток.

В 1958 г. *Р. Робертсом* был предложен термин «рибосома». Рибосомы — внутриклеточные органоиды, на которых осуществляется синтез белка. С открытием рибосом был окончательно разработан подход к реальному управлению синтетической функцией клетки, так как было открыто последнее неизвестное до тех пор звено в синтезе полипептидных цепей в клетке.

В 1957 г. *А. Н. Белозерский* и *А. С. Спирин* на основании систематического сравнительного анализа состава ДНК и РНК у бактерий предсказали существование информационной РНК.

В 1957 г. *А. Корнберг* со своими коллегами впервые в чистом виде выделили фермент ДНК-полимеразу из бактериальных клеток. Этот фермент катализирует синтез ДНК из всех дезоксирибонуклеозидов: аденозинтрифосфата, гуанозинтрифосфата, цитозинтрифосфата, тимидинтрифосфата. Эти данные явились новым под-

тверждением модели структуры и функционирования ДНК.

Изучение обмена нуклеиновых кислот привело к открытию нуклеаз — ферментов, принадлежащих по характеру действия к фосфодиэстеразам, которые специфически расщепляют межнуклеотидные связи в полинуклеотидных цепях без образования неорганического фосфата.

В 1959 г. *М. Лясковский* предложил разделить нуклеазы на две категории по способу действия на субстрат — на эндонуклеазы и экзонуклеазы. Первые расщепляют полинуклеотидную цепь между внутренними нуклеотидами, а вторые катализируют последовательное отщепление мононуклеотидов от конца полинуклеотидной цепи. Открытие механизма действия нуклеаз и использование их для практических целей имело большое значение для расшифровки последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК и РНК. Отщепление нуклеотидов с последующим определением продуктов распада нуклеиновых кислот дало ключ для понимания многих явлений, связанных с функционированием нуклеиновых кислот.

В середине 60-х годов исследователи *Р. Холли, Г. Цахау, А. А. Баев* и другие разработали принцип определения последовательности нуклеотидов в РНК, который лег в основу изучения структурно-функциональной организации отдельных РНК.

В 1961 г. *Ф. Крик* сформулировал основные свойства генетического кода. Он математически и экспериментально доказал существование кодирования генетической информации.

В 1961 г. *Ф. Жакоб* и *Д. Моно* установили общий принцип работы оперона — группы генов, определяющих синтез функционально связанных ферментов. Эта модель явилась мощным стимулом в разработке практического использования знаний о нуклеиновых кислотах, включая и развитие генной инженерии.

В 1965 г. *Ф. Крик* выдвинул гипотезу неоднозначного соответствия. Развитие этой гипотезы вылилось в разработку общих принципов структуры генетического кода, что позволило объяснить механизм соответствия кодонов аминокислотам. Одновременно *М. Ниренберг* и его сотрудники экспериментально доказали, что генетический код содержит равнозначные, как бы взаимозаменяемые кодоны. Они обнаружили, что фенилалани-

новая транспортная РНК может присоединяться к двум различным кодонам: как к кодону урацил-урацил-урацил, так и к кодону урацил-урацил-цитозин.

В 50-х годах XX в. появилась возможность наблюдать и описывать каждую хромосому человека в виде самостоятельной единицы. Все хромосомы были строго идентифицированы. В основе идентификации лежали два признака: общая длина хромосомы и расположение центромеры — первичной перетяжки хромосомы. Этот метод прост, позволяет диагностировать многие хромосомные болезни, а также изучать мутационный процесс.

В 1956 г. *Д. Тжио* и *А. Леван* установили, что хромосомный набор человека состоит из 46 хромосом. Эта дата считается датой рождения современной цитогенетики человека. К тому времени уже успешно культивировались клетки вне организма, применялись особые способы получения пригодных для проведения хромосомного анализа метафазных пластинок, т. е. пластов клеток, находящихся в метафазе.

В 60-е годы окончательно сформировалась новая научная дисциплина — клиническая цитогенетика. Были открыты многочисленные нарушения органов, обусловленные отклонением числа хромосом или изменением их структуры, определена общая частота хромосомных болезней среди новорожденных, а также частота синдромов, связанных с нарушениями в хромосомах.

В это же время ученые начали обстоятельно исследовать хромосомные аномалии с помощью новых методов, основанных на последних достижениях в изучении структуры нуклеиновых кислот. Было установлено, что хромосомные болезни начинают проявляться уже на самой ранней стадии развития зародыша, а некоторые хромосомные нарушения вызывают его гибель. Накопление знаний о нуклеиновых кислотах и последствиях изменений их структуры в 60—70-х годах привело к появлению в разных странах медико-генетических учреждений для оказания медицинской помощи лицам, страдающим наследственными заболеваниями.

Начиная с 70-х годов XX в. разработка методов дифференциальной окраски хромосом для клинической цитогенетики позволила выявить каждую хромосому в ядре клетки, дала возможность во многих случаях судить о происхождении аномальных хромосом. Успех клинической цитогенетики продолжает развиваться и в настоящее время: выделены редкие наследственные

заболевания, обусловленные нарушением отдельных сегментов хромосом, а число известных наследственных признаков у человека к 1978 г. достигло 2811.

К началу 80-х годов список наследственных болезней, связанных с обменом аминокислот, насчитывал более 60 наименований. Каждое из таких заболеваний встречается довольно редко. Частота их распространения среди новорожденных колеблется от 1:20 000 до 1:100 000. Но в сумме они составляют значительную часть всех наследственных заболеваний.

Таким образом, история развития знаний о нуклеиновых кислотах наглядно демонстрирует постепенный переход от феноменологии нуклеиновых кислот к их экспериментальному и теоретическому изучению с последующим выходом в практику.

Но что же все-таки представляют собой нуклеиновые кислоты? Перейдем сначала к рассмотрению их строения.

Глава 2

КАК ПОСТРОЕНЫ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

В этой главе будет рассматриваться только принципиальное строение нуклеиновых кислот, так как в связи с чрезвычайной их сложностью конкретное взаимное расположение частей в составе большинства из них до сих пор остается неизвестным. Однако в связи с прогрессом в методах исследования нуклеиновых кислот можно решить и эту задачу.

Чтобы реально оценить трудность установления строения нуклеиновых кислот, достаточно подсчитать, сколько их находится, например, в бактерии кишечной палочки. Оказалось, что это число составляет около 1000 различных нуклеиновых кислот. Высшие животные и растения содержат нуклеиновые кислоты в еще большем количестве. Причем каждый вид организмов содержит свой, характерный только для него, набор этих кислот. В природе насчитывается более 1 200 000 видов живых организмов — от бактерий до человека. Это значит, что существует примерно 10^{10} различных нуклеиновых кислот. Смогла ли создать природа совершенно различные химические вещества с различной химической формулой в таком большом числе живых организмов? Конечно, нет. Более того, нуклеиновые кислоты построены всего лишь из четырех структурных единиц — четырех азотистых оснований. Как же могут четыре азотистых основания закодировать 10^{10} нуклеиновых кислот? Приблизительно так же, как и мы кодируем наши мысли на бумаге. Мы устанавливаем последовательность из букв алфавита, группируя их в слова, а природа кодирует наследственную информацию, устанавливая последовательность из множества нуклеотидов. Нуклеотид — это сравнительно простой мономер, из

молекул которого построены нуклеиновые кислоты. Каждый нуклеотид в свою очередь состоит из нескольких соединенных вместе молекул: из азотистого основания, сахара (рибоза или дезоксирибоза) и фосфорной кислоты. Главной частью нуклеотида являются азотистые основания. Что они представляют из себя?

АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ

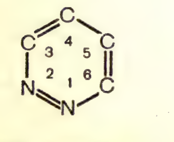
Азотистые основания относятся к азотсодержащим гетероциклическим соединениям. Они имеют циклическую структуру, в состав которой наряду с атомами углерода входят атомы других элементов, в частности атомы азота. По наличию в составе молекулы атома азота эти соединения и получили свое название — азотистые. С этими атомами связаны и важнейшие свойства азотистых оснований, например их слабоосновные (щелочные) свойства. Отсюда и название эти соединения получили «основания» (рис. 1).

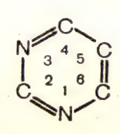
В нуклеиновых кислотах встречаются азотистые основания двух классов: пиримидиновые и пуриновые. Они содержат более одного атома азота в составе молекулы и образуются на основе характерной структуры пиримидина и пурина:

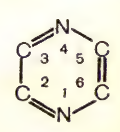
пиримидин

пурин

Пиримидиновые основания являются производными шестичленного гетероцикла пиримидина. Пиримидин в чистом виде — это бесцветное кристаллическое вещество, относящееся к классу диазинов — шестичленных гетероциклов с двумя атомами азота. Существуют три структуры диазинов: пиридазин, или 1,2-диазин (1), пиримидин, или 1,3-диазин (2), и пиразин, или 1,4-диазин (3):


пиридазин
1,2-диазин


пиримидин
1,3-диазин


пиразин
1,4-диазин

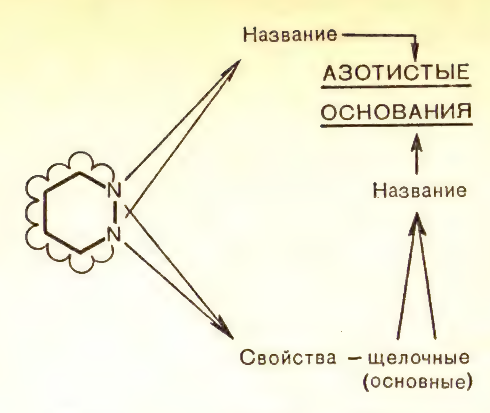


Рис. 1. Связь структуры, свойств и названия азотистых оснований.

Пиримидин имеет характерные для класса диазинов свойства — плавится при температуре 22 °С, температура его кипения составляет 124 °С, обладает хорошей растворимостью в воде. При этом он не дает щелочной реакции, но образует соли с сильными кислотами.

Интересно, что барбитуровая кислота, являющаяся основой многих успокаивающих и снотворных препаратов, служит исходным соединением при синтезе пиримидина и в присутствии пентахлорида фосфора (PCl_5) с последующим восстановлением трихлорпиримидина йодоводородом:

$$\text{барбитуровая кислота} \xrightarrow{PCl_5} \text{2,4,6-трихлорпиримидин} \xrightarrow{HI} \text{пиримидин}$$

По сути дела, барбитуровая кислота является одним из оксипроизводных пиримидина, которые обладают уже довольно сильными кислотными свойствами по сравнению с пиримидином.

К наиболее распространенным пиримидиновым основаниям относятся урацил, или 2,4-диоксипиримидин (1), тимин, или 5-метил-2, 4-диоксипиримидин (2), цитозин, или 2-окси-4-аминопиримидин (3):

урацил
2,4-диоксипиримидин

тимин
5-метил-
2,4-диоксипиримидин

цитозин
2-окси-4-амино-
пиримидин

Пуриновые основания являются производными гетероцикла пурина. Пурин относится к бициклическим соединениям и состоит из пиримидинового шестичленного и имидазольного пятичленного колец. Пурин в чистом виде представляет собой бесцветные кристаллы. Нумерация атомов пуринового кольца отличается от нумерации атомов пиримидинового кольца. Это следует запомнить, чтобы избежать путаницы при обозначении производных этих оснований.

Условно можно считать, что пурин — это производное пиримидина, так как состоит из конденсированных колец пиримидина и имидазола. Следовательно, по своему происхождению все азотистые основания формально можно отнести к производным пиримидина.

К пуриновым основаниям относятся аденин, или 6-аминопурин (1), гуанин или 2-амино-6-оксипурин (2):

аденин
6-аминопурин

гуанин
2-амино-6-оксипурин

В природе существует всего пять основных азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. Они встречаются во всех клетках, начиная от самых простых — клеток микоплазм, до самых сложных — клеток человека.

Сокращенно два главных пуриновых азотистых основания — аденин и гуанин — обозначают заглавными буквами А и Г, а пиримидиновые основания — урацил, тимин и цитозин — У, Т и Ц. Урацил входит в состав

только РНК, тимин — в основном в ДНК и очень редко — в некоторые РНК. Тимин и урацил имеют окисленный атом углерода в положении 4. В цитозине же этот атом аминирован, т. е. связан с аминогруппой ($—NH_2$). Аденин и гуанин встречаются как в ДНК, так и в РНК. Основным структурным их отличием является то, что атом углерода в положении 6 в гуанине окислен, а в аденине аминирован.

При изучении пространственной конфигурации молекул азотистых оснований установлено, что все они имеют плоское строение в виде пластин. Но у пуриновых оснований в месте соединения двух колец наблюдается как бы излом плоскости.

Иногда в состав нуклеиновых кислот входят так называемые минорные азотистые основания. Они получили такое название потому, что встречаются очень редко. К минорным пиримидиновым основаниям относятся следующие вещества:

5-метилцитозин

5-оксиметилцитозин

Также существуют минорные пуриновые основания:

2-метиладенин

1-метилгуанин

Они обнаружены в некоторых РНК, в частности в транспортной РНК, а также в нуклеиновых кислотах вирусов. Возможно, что минорные основания представляют собой одну из ветвей развития пиримидиновых и пуриновых оснований. Но в отличие от обычных азотистых оснований минорные основания в процессе эволюции не получили широкого распространения. По-видимому, это обстоятельство связано с особенностью физико-химических свойств данных молекул.

По строению минорные основания представляют собой метилированные формы обычных оснований. Считают, например, что метилирование, т. е. присоединение метильной группы ($—CH_3$), транспортных РНК осуществляется специфическими ферментами уже после образования полинуклеотидной последовательности. Метилирование меняет свойства нуклеиновых кислот и ведет к изменению содержания генетической информации, закодированной в нуклеиновых кислотах. Так, метилирование аденина и цитозина, входящих в состав ДНК-фагов — вирусов, поражающих бактерии и другие микроорганизмы, приводит к тому, что такие фаги размножаются во всех штаммах (разновидностях) клеток кишечной палочки. Фаги, содержащие неметилированную ДНК, при попадании в клетки одного из штаммов разрушаются кишечной палочкой.

Свободные пиримидиновые и пуриновые азотистые основания имеют сходные свойства. И те и другие растворимы в воде, но довольно плохо.

Явление таутомерии представляет взаимное превращение одной структурной формы молекул в другую. Причем изомеры имеют одну и ту же химическую формулу, но различное структурное строение и, следовательно, различные свойства. Чаще всего наблюдается так называемая лактим-лактамная таутомерия. Например, один из изомеров урацила представляет собой лактимную форму, а другой — лактамную:

OH, N, C, CH, HO—C, CH, N ⇄ O, HN, C, CH, O=C, CH, N, H

лактимная форма — лантамная форма

Таутомеризация урацила происходит за счет перемещения атома водорода от кислорода к азоту и наоборот. В растворе обе эти формы присутствуют одновременно. Существует так называемое динамическое равновесие, когда, несмотря на постоянно протекающие взаимные переходы молекул из одного состояния в другое, в растворе поддерживается строго постоянное соотношение тех и других форм.

Таутомерное равновесие зависит от температуры,

природы растворителя и от степени связывания с белками и другими молекулами. Переход в ту или иную таутомерную форму зависит также от кислотно-щелочных свойств раствора. Например, в нейтральной среде, при pH 7,0, преобладает лактамная форма урацила.

Таутомерия азотистых оснований играет большую роль в функционировании нуклеиновых кислот, в частности она является причиной некоторых мутаций. Каждое азотистое основание, входящее в состав ДНК, находится в определенной таутомерной форме. Если в результате каких-либо воздействий азотистое основание перешло в другую таутомерную форму, то соответствующее ему азотистое основание в противоположной цепи ДНК будет уже другим. Например, азотистое основание аденин образует водородные связи с цитозином. А таутомер аденина — иминоформа — может образовать комплементарную пару только с другим азотистым основанием — с тимином. Таутомерный переход аденина в иминоформу следующий:

аденин ⇄ иминоформа аденина

При повторении гена в результате размножения клеток получится неверная копия, где вместо цитозина будет располагаться тимин.

Появившееся таким образом нарушение в кодировании генетической информации закрепляется и передается по наследству — возникает мутация.

НУКЛЕОЗИДЫ И НУКЛЕОТИДЫ

Азотистые основания не единственный вид химических веществ, из которых построены нуклеиновые кислоты. При гидролизе нуклеиновых кислот оказалось, что они распадаются с образованием и других продуктов: углеводов и ортофосфорной кислоты. В качестве углеводов в нуклеиновых кислотах находятся рибоза ($C_5H_{10}O_5$) и дезоксирибоза ($C_5H_{10}O_4$), которые отно-

сятся к пентозам, т. е. содержат пять атомов углерода.

В результате соединения азотистого основания и углевода образуется молекула — нуклеозид.

Нуклеозиды относятся к классу соединений, известных под названием гликозиды. Гликозиды не разрушаются щелочами. Но в кислотах и особенно при нагревании они быстро разлагаются, т. е. гидролизуются. Так как нуклеозиды относятся к этому классу соединений, то они, естественно, быстро гидролизуются в кислых средах при нагревании и чрезвычайно устойчивы к действию щелочей.

Следует отметить, что не все нуклеозиды подвергаются гидролизу, не все они одинаково устойчивы к разрушающему воздействию кислоты и температуры. Установлено, что пиримидиновые нуклеозиды более устойчивы к гидролизу, чем пуриновые. Механизм этого явления не совсем ясен.

Гидролиз нуклеозидов можно вызвать без нагревания и воздействия кислотами. Оба типа нуклеозидов хорошо гидролизуются в присутствии специфических ферментов, называемых нуклеозидами.

В изолированном виде нуклеозиды можно получить гидролизом нуклеотидов ферментативно или также при действии аммиаком, отщепив фосфорную кислоту от оставшихся связанными гетероцикла и углевода. В мононуклеотидах имеется связь с 5′-фосфатным остатком. Эта связь является достаточно прочной и не поддается кислотному гидролизу. Гидролитически отщеплять фосфатную группу в 5′-положении способен только специфический фермент — 5′-нуклеотидаза. Этот фермент расщепляет связь в 5′-положении, не затрагивая других связей.

Структура дезоксирибозы отличается от структуры рибозы тем, что при 2-м атоме углерода дезоксирибозы нет гидроксильной группы:

$$\underset{OH}{\overset{5}{CH_2}}-\underset{OH}{\overset{4}{CH}}-\underset{OH}{\overset{3}{CH}}-\underset{OH}{\overset{2}{CH}}-\overset{1}{C}\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow H}$$

рибоза

$$\underset{OH}{\overset{5}{CH_2}}-\underset{OH}{\overset{4}{CH}}-\underset{OH}{\overset{3}{CH}}-\overset{2}{CH_2}-\overset{1}{C}\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow H}$$

дезоксирибоза

Это отразилось и в ее названии.

В составе нуклеиновых кислот молекулы этих сахаров находятся не в альдегидной, а в циклической форме. При замыкании кольца карбонильная группа

(первый атом углерода) взаимодействует с гидроксилом четвертого атома углерода. В результате перегруппировки атомов образуется пятичленный цикл. В водном растворе циклические формы пентоз находятся в подвижном равновесии с альдегидными формами.

Пентозы в сухом виде представляют собой сладкие на вкус кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде.

Пентозы при окислении по альдегидной группе образуют кислоты. Например, рибоза при окислении дает рибоновую кислоту:

$$\overset{5}{C}H_2(OH)-\overset{4}{C}H(OH)-\overset{3}{C}H(OH)-\overset{2}{C}H(OH)-\overset{1}{C}(=O)OH$$

При восстановлении пентозы превращаются в многоатомные спирты. Так, при восстановлении рибозы водородом образуется пятиатомный спирт — рибит.

Путем проведения сложных химических анализов было установлено, что в пиримидиновых основаниях пентоза присоединена к первому атому азота данного основания. Пуриновые основания связаны через атом азота, находящийся в 9-м положении. Это показано на примере строения пуриновых нуклеозидов — соединений азотистого основания аденина и углевода рибозы или дезоксирибозы: аденозина и 2′-дезоксиаденозина:

аденозин   2′– дезоксиаденозин

Нуклеозиды не только существуют в природе, но их можно синтезировать искусственно. Вообще же нуклеозиды могут состоять из самых различных углеводов

и гетероциклических соединений. Но в состав нуклеиновых кислот, выделенных из ядер различных клеток, входят только рибонуклеозиды и дезоксирибонуклеозиды, содержащие пиримидиновые и пуриновые азотистые основания. Нуклеозиды растворяются в воде лучше, чем исходные азотистые основания.

Перейдем теперь к рассмотрению нуклеотидов. Нуклеотиды являются мономерными структурными единицами соответствующих нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеотиды — ДНК, а рибонуклеотиды — РНК. Биосинтез нуклеотидов является первым этапом в биосинтезе нуклеиновых кислот и относится к жизненно важным процессам. Эти молекулы являются непосредственными предшественниками РНК и ДНК, а также нуклеотидных коферментов.

Нуклеотиды представляют собой фосфорные эфиры нуклеозидов. В состав нуклеотидов входят все три исходные компонента: пентоза, азотистое основание и остаток ортофосфорной кислоты. Если от нуклеотида отщепить фосфорную кислоту, получится нуклеозид, т. е. нуклеотид — это нуклеозид, соединенный с остатком фосфорной кислоты.

В молекуле нуклеозидов имеется несколько свободных, незанятых гидроксильных групп. Поэтому существует и несколько возможных мест, к которым может присоединиться фосфатная группа к кольцу пентозы при образовании нуклеотида. В молекулах дезоксирибонуклеотидов таких мест существует два: в положениях 3′ и 5′. По этим положениям между дезоксирибозой и фосфорной кислотой может образоваться сложноэфирная связь.

Структурная формула главных дезоксирибонуклеозид-5′-монофосфатов имеет следующий вид:

гетероциклическое основание

Дезоксирибонуклеозид-5′-монофосфаты называют еще 5′-дезоксирибонуклеотидами, а рибонуклеозид-5′-монофосфаты соответственно — 5′-рибонуклеотидами. Широкое распространение получили обиходные их на-

звания: адениловая кислота — нуклеотид аденозина, гуаниновая кислота — нуклеотид гуанозина, уридиловая кислота и т. д.

У рибонуклеотидов фосфатная группа может присоединяться по трем положениям в кольце пентозы:

аденозин-5′-фосфорная кислота (адениловая кислота; 5′-адениловая кислота)

аденозин-3′-фосфорная кислота (3′-адениловая кислота)

аденозин-2′-фосфорная кислота (2′-адениловая кислота)

аденозин-3′,5′-фосфорная кислота (циклическая адениловая кислота, циклический АМФ)

Нуклеиновые кислоты составлены из нуклеотидов как цепь из звеньев или как столбик монет. Нуклеотиды в них связаны между собой сложной связью остатка фосфорной кислоты с гидроксилом пентозы следующего нуклеотида. В ДНК и РНК фосфодиэфирные мостики соединяют 3′-гидроксильную группу одного нуклеотида с 5′-гидроксильной группой другого:

основание 1

основание 2

основание 3

ДНК

основание 1

основание 2

основание 3

РНК

Раствор нуклеотидов обладает сильными кислотными свойствами. Поэтому при нейтральных значениях pH в нейтральных средах свободные нуклеотиды находятся в диссоциированном состоянии.

В природе существуют не только рибонуклеозиды и дезоксирибонуклеозиды, представленные выше. В биологических объектах, в живых клетках встречаются и другие их формы и варианты, например в виде 5′-дифосфатов и 5′-трифосфатов. Иначе они называются 5′-пирофосфорные и 5′-трифосфорные эфиры нуклеозидов. Термин «пирофосфорный» означает «содержащий две молекулы фосфорной кислоты». Общая структура

нуклеотидов с разным содержанием молекул фосфорной кислоты выглядит так:

$$HO-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{OH}{|}}{P}}\sim O-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{OH}{|}}{P}}\sim O-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{OH}{|}}{P}}-O-CH_2-\text{(рибоза: 5', 4', 3', 2', 1'; H, OH, OH, H)}-\text{основание}$$

нуклеозид-5′-монофосфат

нуклеозид-5′-дифосфат

нуклеозид-5′-трифосфат

Нуклеозид-5′-дифосфорная и нуклеозид-5′-трифосфорная кислоты могут диссоциировать. При их диссоциации из фосфатных групп освобождаются три или четыре протона. В присутствии ионов магния (Mg^{2+}) и кальция (Ca^{2+}) фосфатные группы нуклеозид-5′-дифосфатов и нуклеозид-5′-трифосфатов формируют с ними комплексы. Формировать комплексы могут не только ионы магния и кальция, но и любые другие двухвалентные ионы металлов. В реальных условиях живой природы в клетке эти нуклеотиды образуют комплексы с ионами магния.

Последняя и предпоследняя фосфатные группы нуклеозид-ди- и трифосфатов могут расщепляться с помощью специальных ферментов, которые, расщепляя эти группы, не затрагивают другие связи.

При синтезе ДНК нуклеозид-5′-трифосфаты являются незаменимыми строительными блоками. Дело в том, что при синтезе как ДНК, так и РНК в качестве исходных строительных блоков используются только эти нуклеотиды. Дифосфаты и монофосфаты нуклеозидов не используются в синтезе ДНК и РНК. Это связано с тем, что нуклеозид-5′-трифосфаты являются высокоэнергетическими предшественниками мононуклеотидов. В этом заключается важная функция нуклеозидтрифосфатов при ферментативном синтезе нуклеиновых кислот.

В процессе синтеза ДНК или РНК от нуклеозид-5′-трифосфатов отщепляется концевая пирофосфатная группа. Нуклеозидтрифосфат последовательно превра-

щается в нуклеозиддифосфат, а затем в нуклеозидмонофосфат, входящий в состав полинуклеотидных цепей нуклеиновых кислот.

Таким образом, синтез нуклеиновых кислот в процессе жизнедеятельности организма осуществляется из высокоэнергетических предшественников нуклеиновых кислот. Отсюда видна важность для организма сочетания всех звеньев обмена, а не только процессов непосредственного синтеза нуклеиновых кислот.

Нуклеотиды в виде различных биологически активных соединений играют важную роль в обмене веществ в клетке и в организме в целом. Так, пуриновый нуклеотид — адениловая кислота — в виде аденозинтрифосфата (АТФ)

является главным носителем химической энергии в клетках всех живых организмов. При передаче своей энергии другим молекулам он теряет концевую фосфатную группу и превращается в аденозиндифосфат (АДФ). Аденозиндифосфат — это менее энергоемкое соединение по сравнению с АТФ. Но АДФ может вновь получить запас химической энергии, присоединив фосфатную группу и превратившись в АТФ. Этот процесс называется фосфорилированием. Для превращения АДФ в АТФ требуется приток какой-либо энергии извне. Эта энергия может быть привнесена либо за счет солнечных лучей в случае фотосинтеза в растительных клетках, либо за счет химической энергии в процессе обмена веществ в гетеротрофных клетках, т. е. клетках организмов, питающихся органическими веществами.

За счет функционирования системы АТФ — АДФ осуществляется взаимосвязь типов ферментных реакций в клетке. В одной из них химическая энергия, поступающая из окружающей среды, запасается в виде АТФ. В другом типе реакций, наоборот, энергия АТФ используется для нужд клетки. Такие ферментные реакции характерны для всех видов живых существ.

Гидролиз АТФ обеспечивает энергией процесс активного транспорта веществ через мембраны клеток. Гидролиз, или расщепление, АТФ осуществляют мембранные АТФ-азы. Ферментов такого типа много. Существуют, например, K^+, Na^+-АТФ-азы, которые обеспечивают перенос ионов K^+ внутрь клетки и выход ионов Na^+ наружу. K^+, Na^+-АТФ-азы работают только в присутствии этих ионов. Активность ферментов регулируется гормонами.

Нуклеотиды играют большую роль и в других биохимических реакциях — в качестве биологически активных соединений они регулируют практически все виды обмена веществ в клетке.

Некоторые нуклеотиды являются переносчиками строительных блоков в клетке. Например, уридиндифосфат является специфическим переносчиком сахаров при синтезе полисахаридов.

Цитидиндифосфатхолин является донором холина при биосинтезе холинсодержащих молекул, участвующих во многих процессах обмена в клетке.

В никотинамидмононуклеотиде и коферменте А азотистое основание связано с рибозой с помощью β-N-гликозидной связи. Никотинамидмононуклеотид является предшественником нитокинамидадениндинуклеотида (НАД).

Кофермент А выполняет функцию переноса ацильных групп при доставке их различным акцепторам.

Большое значение для многих сторон обмена веществ в клетке имеют и динуклеотиды. В 1905 г. после многих экспериментов было установлено, что для спиртового брожения, являющегося основой промышленного производства этилового спирта, необходимо присутствие кофермента, обладающего специфическими свойствами. Этим ферментом является никотинамидадениндинуклеотид, относящийся к классу динуклеотидов.

Динуклеотиды состоят из двух мононуклеотидов. Соединяются мононуклеотиды через фосфатный мостик между 5-м углеродным атомом рибозы или дезоксирибозы одного нуклеотида и 3′-м углеродным атомом сахара другого нуклеотида. Таким образом, у большинства нуклеотидов мостик между двумя единицами образован за счет 3,5′-фосфодиэфирной связи. У очень небольшого количества динуклеотидов связь осуществляется через другие положения. Фосфатный мостик образован за счет какой-либо иной связи.

Флавинмононуклеотид (ФМД), принимая участие в клеточном дыхании, выполняет функцию оксилительно-восстановительного кофермента. В качестве азотистых оснований в флавинмононуклеотиде и никотинамидмононуклеотиде служат соответственно диметилизоаллоксазин и никотинамид. Мононуклеотидные коферменты содержат в своем составе какой-либо витамин группы В:

никотинамидмононуклеотид

флавинмононуклеотид

кофермент А

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) и флавинаденин нуклеотид (ФАД) — все они содержат аденозин-5′-фосфат и имеют две мононуклеотидные единицы, связанные между собой ангидридной связью. Между их фосфатными группами образуется 5′, 5′-пирофосфатная связь. В состав первых двух веществ входит никотинамид, а последний содержит флавин. НАДФ по сравнению с НАД имеет еще одну, дополнительную молекулу фосфорной кислоты. НАД и аналогичные динуклеотиды ответственны за многие жизненно важные функции организма.

Таким образом, нуклеиновые кислоты построены из мононуклеотидов, которые в свою очередь состоят из азотистых оснований, пентоз и ортофосфорной кислоты. Кроме функции структурных компонентов в нуклеиновых кислотах, моно- и динуклеотиды выполняют самостоятельную функцию биологически активных веществ.

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В ходе обмена поступившие в организм вещества посредством биохимических реакций превращаются в собственные нуклеиновые кислоты организма, затем нуклеиновые кислоты разрушаются и в виде отдельных составных частей выводятся из организма. Образование и распад нуклеиновых кислот осуществляется в несколько этапов:

1. Извлечение энергии из окружающей среды и преобразование ее в энергию таких соединений, как АТФ. Эта функция необходима для энергетического обеспечения процессов биосинтеза и расщепления нуклеиновых кислот.

2. Образование компонентов нуклеиновых кислот из их предшественников, которые поступают в клетку извне, т. е. синтез нуклеотидов и отдельных их частей.

3. Синтез нуклеиновых кислот из нуклеотидов.

4. Разрушение нуклеиновых кислот. Осуществляется в обратном порядке следования с образованием конечных продуктов, удобных для выведения из организма.

Обмен нуклеиновых кислот в клетке характеризуется двумя особенностями. С одной стороны, он обладает высокой устойчивостью к действию неблагоприят-

ных факторов окружающей среды. С другой стороны, имеет значительную изменчивость, что проявляется в зависимости скорости его протекания от многих регулирующих факторов. Такое сосуществование противоположных свойств необходимо для приспособления обмена нуклеиновых кислот к изменению условий внешней и внутренней среды. Отсутствие таких особенностей приводило бы к сбою в передаче наследственной информации и реализации этой информации при синтезе белковых молекул. Нарушение синтеза белка привело бы клетку к гибели.

Диалектическое единство двух указанных свойств проявляется в согласованности процессов синтеза и распада нуклеиновых кислот. Синтезируется именно столько, например, *т*РНК, сколько их необходимо для своевременной доставки аминокислот к строящейся цепи полипептида. Избыток приведет к необоснованному расходованию строительных материалов (рибонуклеотидов) и энергии, необходимой на построение *т*РНК, а также ферментных и нуклеиновых систем, участвующих в этом синтезе. Недостаток сразу же скажется на скорости синтеза белка и, как следствие, приведет к нарушению работы соответствующих ферментных систем, выполняющих в клетке специфические функции. Поэтому скорость биосинтеза нуклеиновых кислот, особенно РНК, определяется их потребностью на данный момент времени. Клетка синтезирует РНК именно с той скоростью, которая необходима для того, чтобы обеспечить в последующем синтез требуемого клетке количества белка.

Простейший механизм регуляции синтеза нуклеиновых кислот осуществляется за счет регуляции скорости протекания ферментных реакций. Скорость протекания ферментной реакции зависит от величины pH среды, концентрации фермента, концентрации субстрата, концентрации продукта реакции, наличия активаторов или ингибиторов реакции.

Следующий уровень регуляции касается многоферментных систем, где в процессе синтеза принимает участие ряд ферментов, расположенных в определенной последовательности. Такая система имеет в своем составе специальные ферменты, которые управляют активностью других ферментов. Регуляторные ферменты обычно располагаются в начале всей последовательности ферментов.

Третьим уровнем регуляции обмена нуклеиновых кислот служит генетический уровень. Ферменты, участвующие в обмене нуклеиновых кислот, представляют собой белки, и синтез их осуществляется с участием специальных нуклеиновых кислот. Генетический контроль определяет скорость синтеза этих ферментов.

У высших животных и человека существуют еще два уровня регуляции обмена нуклеиновых кислот: гормональный и нервный. Важная особенность этих уровней заключается в том, что они связывают воедино далеко удаленные друг от друга органы и ткани.

Гормональный уровень регуляции заключается в том, что увеличение синтеза или распада нуклеиновых кислот или снижение этих процессов осуществляется под непосредственным действием гормонов, которые вырабатываются эндокринными органами, т. е. органами, вырабатывающими специфические гормоны. Гормоны выходят из эндокринных органов и стимулируют или подавляют скорость протекания ферментных реакций в других тканях и органах.

Многие биологически активные вещества, например простагландины, также регулируют обмен нуклеиновых кислот. Известно, что простагландин $F_{2\alpha}$ снижает синтез ДНК и, следовательно, синтез белка. В 1981 г. С. С. Мисюлиным, М. П. Шерстневым и другими исследователями было показано, что под действием простагландина $F_{2\alpha}$ снижается устойчивость мембран клеток к поврежденному действию пероксида водорода, повышается проницаемость мембран для ионов и крупных белковых молекул. Увеличивается способность мембранных белков генерировать активные формы кислорода при действии одного и того же количества пероксида водорода. Известно, что активные формы кислорода вызывают повреждения в молекуле ДНК, приводящие к нарушению ее функции.

По-видимому, в повреждении ДНК увеличение проницаемости и усиление способности к генерации активных форм кислорода являются параллельными и взаимосвязанными процессами. Повышение проницаемости способствует проникновению к ДНК не только активных форм кислорода, но и других повреждающих агентов. Увеличивается доступность ДНК для повреждающих агентов любых видов, что сопровождается увеличением частоты мутаций.

Высшим и наиболее совершенным регулятором обме-

на нуклеиновых кислот является нервная система, которая объединяет в единое целое в организме как собственно обмен нуклеиновых кислот, так и вообще обмен веществ в организме. Наиболее часто нервная регуляция осуществляется посредством выделения гормонов в кровь. Изменения в обмене нуклеиновых кислот могут происходить под действием как внешних, так и внутренних факторов среды.

К внешним факторам относятся нарушения питания организма, поступление в организм чужеродных, например токсичных, веществ, в том числе и бактериальных токсинов, вирусов, изменение состава выдыхаемого воздуха, в частности появление в нем угарного газа (CO), попадание в организм солей тяжелых металлов, соединений мышьяка, цианидов, канцерогенов.

К внутренним факторам относятся генетически обусловленные дефекты ферментов, принимающих участие в метаболизме нуклеиновых кислот, дефекты белков, принимающих участие в регуляции свободнорадикальных, т. е. наиболее активных, процессов, иммунных белков, белковых и пептидных гормонов.

Наиболее часто нарушения обмена нуклеиновых кислот являются следствием мутаций или изменений в процессе транскрипции ДНК при синтезе информационной и других типов РНК. Причиной нарушения синтеза нуклеиновых кислот может быть блокирование отдельных стадий синтеза нуклеотидов.

Биосинтез нуклеиновых кислот из отдельных мононуклеотидов представляет собой особую область химических и биохимических исследований и будет рассмотрен особо в последующих главах. Сейчас мы рассмотрим, как осуществляется биосинтез мононуклеотидов.

БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Полагали, что на первой стадии синтеза пуринов должна образовываться система колец и уже после этого к сложному кольцу присоединяются рибоза и фосфат.

В результате экспериментов, проведенных на животных, оказалось, что атомы пуринового кольца берутся из простых молекул: аминокислоты глутамина, глицина, аспарагиновой и муравьиной кислот.

Происхождение атомов пуринового кольца представлено на следующей схеме.

CO_2 — аспартат — глицин — формиат — формиат — амидный азот глутамина

Попутно заметим, что муравьиная кислота постоянно находится в организме как промежуточный продукт многих биохимических реакций, а формиат — остаток муравьиной кислоты.

Вначале образуются нуклеотиды, где вместо пуринового кольца имеется открытая цепь. Нуклеотиды соединены с рибозой и фосфатом. Следующим этапом синтеза является замыкание кольца и образование пуринового нуклеотида.

Синтез адениловой и гуаниловой кислот начинается с образования фосфорибозилпирофосфата:

рибозо-фосфат

АТФ → АМФ

Это соединение образуется из рибозофосфата, который подвергается ферментативному пирофосфорилированию за счет энергии АТФ. На следующем этапе синтеза пуринов образуется фосфорибозиламин за счет реакции фосфорибозилпирофосфата с глутамином. При этом аминогруппа (-N H_2) амидной части молеку-

лы глутамина замещает ранее присоединенную пирофосфатную группировку. Побочными продуктами этой реакции являются свободная глутаминовая кислота и неорганический пирофосфат. Пирофосфатная группа гидролизуется до ортофосфата с помощью фермента пирофосфатазы.

На третьей стадии образуется аминокислота глицин. Карбоксильная группа (-COOH) глицина вступает в реакцию с аминогруппой полученного на предыдущей стадии фосфорибозиламина. Для протекания этой реакции требуется энергия АТФ. Энергия расходуется на образование амидной связи между глицином и аминосахаром. В результате образуется рибонуклеотид с открытой цепью, а также АДФ и фосфат.

На следующей стадии биосинтеза пуринов происходит присоединение одноуглеродной формильной группы (OCH-), которая дает восьмой атом пуринового кольца. Такая формильная группа образуется из муравьиной кислоты. Переносчиком формильной группы служит специальное соединение метенилтетрагидрофолат, который является донором формильной группы для синтеза пуринов. Образуется формилглицинамидрибонуклеотид:

глицинамидрибонуклеотид

метенилтетрагидрофолат

тетрагидрофолат

формилглицинамид—рибонуклеотид

рибозо-фосфат

На этой стадии атом азота из амидной группировки глутамина соединяется с формильной группой формилглицинамидрибонуклеотида. Энергия для такого превращения освобождается в результате гидролиза фосфат-

ной связи АТФ. Образуется соединение, содержащее пять атомов будущего имидазольного кольца пуринового основания. Происходит замыкание кольца, состоящего из пяти атомов. Одновременно выделяется молекула воды и образуется аминоимидазолрибонуклеотид.

Далее, атом углерода молекулы CO_2 включается в пуриновое кольцо, занимая в нем шестое положение:

аминоимидазол-рибонуклеотид

рибозо-фосфат

CO_2

рибонуклеотид аминоимидазол карбоновой кислоты

$HOOC$

рибозо-фосфат

Происходит реакция карбоксилирования, в результате образуется рибонуклеотид аминоимидазолкарбоновой кислоты. Процесс идет без участия кофермента.

Важным этапом биосинтеза пуриновых оснований является образование инозиновой кислоты — пуринового рибонуклеотида, у которого впервые на пути биосинтеза пуринов появилась завершенная пуриновая кольцевая система. Стадия образования инозиновой кислоты характеризуется тем, что путем переноса формильной группы к аминогруппе рибонуклеотида в пуриновое кольцо вводиться атом углерода. От образовавшейся структуры происходит отщепление молекулы воды и замыкание кольцевой структуры. Инозиновая кислота является непосредственным предшественником адениловой и гуаниловой кислот.

Процесс биосинтеза пуринов до стадии образования инозиновой кислоты требует расхода значительного количества энергии. Начиная с образования рибозофосфата требуется разрыв шести высокоэнергетических фосфатных связей.

Несколько лет потребовалось исследователям, чтобы точно установить все отдельные ферментные стадии сложного процесса синтеза пуринов. Для изучения биосинтеза пуриновых оснований была использована методика с применением меченных радиоактивными атомами веществ, являющихся предшественниками в построении пуриновых оснований.

Важность биосинтеза пуриновых нуклеотидов заключается в том, что пуриновые нуклеотиды являются не только структурными блоками нуклеиновых кислот, но и выполняют самостоятельные функции в виде биологически активных соединений типа АТФ, АМФ и НАД.

БИОСИНТЕЗ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов не так сложен, как пуриновых, поскольку присоединение рибозы к пирамидиновому кольцу осуществляется после его синтеза. Исходными веществами для биосинтеза пиримидинового кольца являются углекислый газ (CO_2) и аммиак (NH_3). У многих бактерий предшественником пиримидинов является оротовая кислота (6-карбоксиурацил):

У высших организмов она образуется в процессе биосинтеза пиримидинового кольца.

Первая стадия биосинтеза пиримидиновых оснований заключается в присоединении молекулы CO_2 к амидной группе глутамина.

В результате последующих реакций пиримидиновое кольцо замыкается с образованием дигидрооротовой кислоты и последующим окислением ее в оротовую кислоту. Окисление осуществляется флавопротеидным ферментом. Путем последующих незначительных превращений из оротовой кислоты образуются соответствующие пиримидиновые азотистые основания. Присоединение сахара и фосфорной кислоты приводит к образованию соответствующего нуклеотида.

РАСПАД НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты под действием ферментов — нуклеаз распадаются на отдельные мононуклеотиды. Существуют две основные нуклеазы: дезоксирибонуклеаза (ДНК-аза) и рибонуклеаза (РНК-аза). Нуклеазы осуществляют специфический ферментный гидролиз межнуклеотидных связей. Между мононуклеотидами существует единственный тип связи — это 3′, 5′-фосфодиэфирная связь. Именно эта связь и разрывается в процессе распада нуклеиновых кислот.

Затем мононуклеотиды подвергаются ферментному гидролизу, в результате которого образуются свободные пуриновые и пиримидиновые азотистые основания. В организме человека пуриновые основания в результате метаболических изменений превращаются в конечный продукт — мочевую кислоту, которая выводится из организма. Это превращение осуществляется под действием фермента ксантиноксидазы. Основные стадии процесса распада пуриновых азотистых оснований на примере аденина представлены на схеме:

аденин

↓ H_2O, $-NH_3$ (аденаза)

гипоксантин

↓ O_2 (ксантиноксидаза) гуанин → H_2O, $-NH_3$ (гуаназа)

ксантин →(O_2, ксантиноксидаза)→ мочевая кислота (енольная форма) ⇄ мочевая кислота (кето-форма)

Пиримидиновые азотистые основания в результате распада и деградации превращаются в мочевину и аммиак. Но, в отличие от пуринов пиримидиновые основания могут использоваться в качестве предшественников для синтеза некоторых аминокислот, например ß-аланина и ß-аминоизомасляной кислоты.

Таким образом, процесс обмена нуклеиновых кислот складывается из двух этапов: биосинтеза нуклеиновых кислот и их распада. Эти два процесса протекают не разрозненно, а взаимосвязанно, сохраняя динамическое равновесие. Такое равновесие позволяет поддерживать структурные и функциональные свойства тканей и органов на оптимальном уровне.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для изучения нуклеиновых кислот используется широкий спектр химических, биохимических, физических и биофизических методов исследования.

Для гистологического исследования распределения ДНК в клетках различных органов на срезах тканей и в мазках микроорганизмов используются различные гистохимические реакции. Например, ДНК способна окрашиваться в темно-пурпурный цвет при обработке фуксином, обесцвеченным сернистой кислотой. Появление окрашивания обусловлено образованием свободных альдегидных групп в молекуле ДНК. Однако присутствие большого количества РНК в ядре создает трудности при окрашивании ДНК. Особенно это характерно для микроорганизмов, в которых ДНК не выделена четко в обособленное ядро и располагается в непосредственной близости к цитоплазматической РНК. Для удаления РНК ее гидролизуют. Гидролиз заключается в том, что после фиксации препараты обрабатывают горячей (60 °С) однонормальной соляной кислотой в течение 7—8 минут. Вместо соляной кислоты гидролиз РНК можно вызвать рибонуклеазой. Продукты гидролиза РНК не дают окрашивания при обработке фуксином.

Прежде чем анализировать нуклеиновые кислоты, их нужно выделить. С этой целью используются различные методы экстракции. В частности, экстрагирование РНК вируса табачной мозаики осуществляют с помощью хлорной ($HClO_4$) кислоты. Для последующего исследо-

вания экстракт либо нейтрализуют, либо выполняют аналитические манипуляции в кислой среде.

Так как нуклеиновые кислоты плохо растворимы в воде, для их выделения используют солевые растворы. В соленой воде нуклеиновые кислоты растворяются лучше.

Для анализа нуклеиновых кислот используют различные химические и биохимические методы их расщепления, например с помощью химического или ферментного гидролиза. По продуктам гидролиза судят о составе нуклеиновых кислот. Избирательный гидролиз межнуклеотидных связей позволяет определять нуклеотидную последовательность нуклеиновых кислот.

Одним из ведущих методов в изучении составных частей нуклеиновых кислот, в частности азотистых оснований, является спектрофотометрический, основанный на поглощении света молекулами пуринов и пиримидинов. Если через раствор оснований нуклеиновых кислот пропускать световой луч, то при данной длине волны доли проходящего через раствор и поглощенного им света относят к толщине поглощающего слоя и концентрации поглощающего вещества. Чем больше поглотилось света при данной длине волны, тем выше концентрация вещества.

Для разделения смесей различных нуклеотидов используют хроматографический метод, суть которого заключается в следующем. В колонку с каким-либо наполнителем, например ионообменной смолой, вносят смесь олигонуклеотидов, полученных предварительно путем расщепления нуклеиновых кислот с помощью соответствующих гидролитических ферментов. Олигонуклеотиды представляют собой небольшую по протяженности цепочку нуклеиновой кислоты, состоящую всего из нескольких азотистых оснований. Под действием силы тяжести олигонуклеотиды, находящиеся в растворе, проходят через колонку. Проще всего задача определения нуклеотидной последовательности решается для *т*РНК, так как молекулы этой РНК относительно невелики.

Фрагменты *т*РНК разделяют хроматографически на колонке, после чего каждый из них полностью расщепляют и уже окончательно определяют нуклеотидный состав. Так как различные нуклеотиды отличаются по строению и несут несколько различный заряд, то они с разной скоростью опускаются в колонке.

Внизу колонки стоят пробирки. Как только в пробирку попадает некоторый строго определенный объем, например 1 мл вытекающего элюента с раствором, подставляют другую пробирку. *Элюент* — это специально подобранный растворитель, извлекающий вещество, в данном случае нуклеотиды, путем его вымывания из колонки. Теперь в пробирках находятся разные нуклеотиды: те, которые проходят через колонку быстро, и те, которые проходят медленно. Раствор нуклеотидов, находящийся в пробирках, анализируют с помощью прибора спектрофотометра. Строится хроматограмма — график зависимости степени поглощения света от порядкового номера пробирки с анализируемым раствором. Чем выше пик поглощения света в данном объеме раствора, тем больше концентрация этого нуклеотида в элюенте.

При разделении фрагментов используют фосфодиэстеразу змеиного яда, которая последовательно отщепляет мононуклеотиды только с одного конца цепи. Установление нуклеотидной последовательности в исследуемом фрагменте осуществляют в результате хроматографии полученных сложных смесей (рис. I). Расщепление и хроматографию проводят многократно.

Кроме хроматографии на ионообменных смолах, можно применять хроматографию на бумаге, хроматографию в тонком слое, а также электрофорез на бумаге.

Уникальным методом исследования нуклеиновых кислот является метод рентгеноструктурного анализа. С его помощью была изучена трехмерная структура пиримидиновых и пуриновых азотистых оснований. Этот метод базируется на изучении дифракции рентгеновских лучей на азотистых основаниях. Дифракция представляет собой рассеяние рентгеновских лучей азотистыми основаниями без изменения длины их волны. Изучение этого рассеяния и дает представление о структуре азотистых оснований и молекулярной организации нуклеиновых кислот вообще.

В генной инженерии для создания рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК широко используется совокупность методов разъединения и соединения нити ДНК с помощью ферментов. К таким ферментам относится фермент рестриктаза, который рассекает молекулу ДНК в строго определенном месте. Другой фермент — лигаза сшивает отдельные участки ДНК в единую нить. Лигазы образуют связи за счет энергии АТФ.

Глава 3

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нашу планету населяет более миллиона различных видов живых организмов. Каждый вид включает огромное число существ, имеющих сходные основные черты и отличающихся в деталях. И все это сходство и различие определяет ДНК. ДНК называют молекулой наследственности. Самовоспроизведение живых организмов неразрывно связано с существованием и репликацией (созданием себе подобной) структуры ДНК. Только на основе ДНК клетки и организм в целом могут воспроизводить себе подобных.

В одной небольшой молекуле ДНК заложена вся информация о многогранных свойствах любого организма. Яркая, пестрая окраска крыльев бабочки, стремительный бросок тигра, гениальный полет мысли человека — все это определено той генетической информацией, которая закодирована в невидимой невооруженным глазом молекуле ДНК.

Эволюционное развитие живых существ тесным образом связано с развитием структурных изменений ДНК. Можно предположить, что эволюция осуществлялась за счет добавления различными путями к нити ДНК дополнительных нуклеотидов. В последующем, если такое сочетание нуклеотидов было оптимальным, вид сохранялся, в противном случае — исчезал. Но простое усложнение ДНК за счет увеличения количества нуклеотидов шло, по-видимому, до какого-то предела. Выше этого предела эволюция шла не за счет увеличения количества нуклеотидов, а за счет их более удачной комбинации в пределах того же количества. Доказательством этому служат наблюдения, что у видов, стоящих по организации и развитию выше, число хромосом

и вообще ДНК в клетке может быть меньше, чем у вида, который на эволюционной лестнице расположен ниже.

Но что из себя представляет ДНК и как она осуществляет регуляцию жизнедеятельности клетки, хранение и передачу наследственной информации?

СОСТАВ И СТРУКТУРА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Молекулы ДНК, выделенные из ядер клеток, в электронном микроскопе представлены в виде длинных нитей, состоящих из большого числа дезоксирибонуклеотидов. Нити ДНК толще и длиннее, чем нити белков. Длина молекулы ДНК достигает сотен тысяч нанометров. Это несравнимо больше самой крупной белковой молекулы, которая в развернутом виде достигает в длину не более 100—200 нм. Молекула ДНК по массе достигает $6 \cdot 10^{-12}$ грамма.

Генетическая информация, заключенная в ДНК, состоит из последовательности нуклеотидов. ДНК состоит в основном из четырех нуклеотидов, которые соответствуют четырем азотистым основаниям: аденину, гуанину, тимину и цитозину. Кроме этих оснований, препараты ДНК могут содержать метилированные производные этих оснований (вспомним минорные основания).

Основную структурную цепь молекулы ДНК образуют последовательно соединенные друг с другом молекулы пентозы и ортофосфорной кислоты. Цепь ДНК представляет углеводно-фосфатную последовательность, с которой соединены азотистые основания. Углеводные и фосфатные группы выполняют только структурную функцию. Молекулы ортофосфорной кислоты соединяют между собой молекулы дезоксирибозы за счет образования химических связей. При взаимодействии гидроксильной группы 3-го атома углерода одной молекулы пентозы с гидроксильной группой 5-го углеродного атома другой молекулы пентозы отщепляется молекула воды. Тогда у остатков ортофосфорной кислоты сохраняется еще по одной гидроксильной группе, способной диссоциировать. Это обусловливает кислотные свойства всей макромолекулы ДНК.

Один конец цепи ДНК несет 5′-OH-группу и фосфат, а другой — 3′-OH-группу. Например, в небольшой ДНК, состоящей из трех звеньев и именуемой тринук-

леотидом аденозин-цитидин-гуанозин (АЦГ), свободная 5′-ОН-группа принадлежит дезоксиаденозину, а свободная 3′-ОН-группа — дезоксигуанозину. Во всех случаях последовательность оснований пишется в направлении от 5′ к 3′.

Для сравнения: аминокислотная последовательность белка пишется в направлении от N-концевой аминокислоты к С-концевой аминокислоте. Исходя из правила написания последовательности азотистых оснований в ДНК, не следует забывать, что АЦГ и ГЦА — это по существу разные тринуклеотиды, так же как и последовательности Глу-Фен-Ала и Ала-Фен-Глу представляют собой разные аминопептиды.

Молекула ДНК имеет две цепи нуклеотидов, расположенных параллельно друг другу, но в обратной последовательности. Эти цепи удерживаются между собой за счет водородных связей между парами аденин—тимин и гуанин-цитозин. При этом азотистые основания располагаются внутри спирали (рис. II). Водородные связи образуются между любым электроотрицательным атомом, например кислородом тимина или азотом аденина и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом:

Между аденином и тимином образуются две водородные связи, между гуанином и цитозином — три. Эти связи играют очень важную роль в поддержании вторичной структуры ДНК.

Водородные связи могут образовываться между двумя молекулами или между двумя различными частями одной и той же молекулы. В тех случаях, когда две молекулы связаны между собой большим числом водородных связей, энергия, требуемая для разделения молекул, больше суммы энергий отдельных водородных

связей. Этот эффект называется эффектом кооперативности водородных связей. Он обусловливает большую прочность соединения двух нитей молекулы ДНК и других нуклеиновых кислот. Именно поэтому нуклеиновые кислоты чрезвычайно стабильны в воде.

Дополнение аденина тимином и гуанина цитозином, иначе называемое комплементарностью, обеспечивает одинаковое по всей длине двойной спирали расстояние между цепями и образование между противоположными основаниями максимального числа водородных связей, что придает молекуле одновременно устойчивость и подвижность. Последовательность оснований в одной цепи ДНК строго соответствует последовательности оснований в другой цепи. Это является необходимым условием функционирования ДНК и передачи наследственной информации. При необходимости двойная спираль ДНК легко рвется под действием фермента дезоксирибонуклеазы.

Структура двухнитевой молекулы ДНК представлена на рисунке III. Молекула ДНК представляет собой спираль, состоящую из двух цепей, закрученных вокруг общей оси. Это вторичная структура ДНК. Диаметр такой спирали составляет около 2 нм (рис. IV). Наложение гистоновых белков на исходную двойную спираль приводит к тому, что она изгибается в виде еще одной спирали. В результате этого диаметр ее увеличивается до 4 нм. Такая цепь образует петлю и скручивается с формированием толстого тяжа диаметром 10 нм. Еще одно скручивание толстого тяжа приводит к образованию суперспирали (рис. V), хорошо видимой в электронный микроскоп. Возможно, что суперспирали представляют собой хромомеры хромосом. Как отмечалось, *хромомеры* — это четкообразные утолщения, периодически располагающиеся вдоль плеча хромосомы.

Молекула ДНК в ядре клетки не существует изолированно сама по себе. Она окружена связанными с ней белками. Но белки не принимают участия в передаче наследственной информации.

Основными белками, локализованными в ядре клеток и связанными с ДНК, являются специальные белки, называемые *гистонами*. Гистоны обладают основными (щелочными) свойствами благодаря высокому содержанию в них основных аминокислот. По-видимому, их действие компенсирует в некоторой степени кислотные свойства нуклеиновых кислот. По преобладающему

содержанию аминокислот выделяют пять важнейших гистонов: гистон H1 имеет высокое содержание лизина, гистон H2b лизина содержит меньше, чем предшествующий гистон, гистон H2a имеет высокое содержание лизина и аргинина, гистон H3 содержит большое количество аргинина, гистон H4 богат аргинином и глицином.

Все гистоны хорошо растворимы в кислых средах. Это свойство лежит в основе метода их экстрагирования из ядер клеток.

Гистоновые белки с неодинаковой прочностью связываются с ДНК. Поэтому они обладают различной способностью менять пространственное расположение нити ДНК и влиять на участие ДНК в процессе транскрипции.

В клетке с репрессированным геномом наблюдается замена одной фракции гистона на другую и изменение аминокислотного состава белка, в частности присутствие в гистонах белка A24, которого не находят во время митоза клетки. Поэтому предполагают, что белок A24 является одним из факторов, препятствующих митотической конденсации дезоксинуклеопротеида в интерфазе. Молекулы гистонов соединяются с ДНК в основном за счет электростатических связей между отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК и положительно заряженными группами гистоновых аминокислот, обладающих щелочными свойствами. В результате образуется нуклеосома. *Нуклеосома* — это комплекс участка ДНК с гистонами. Он имеет небольшую длину и периодически повторяется по всей длине ДНК. В нуклеосому входит от 160 до 240 нуклеотидных пар и по 2 молекулы каждой фракции гистонов H2a, H2b, H3 и H4. В нуклеосомах выделяют основную часть, всегда содержащую постоянное количество ДНК (140—150 пар нуклеотидов) и 8 молекул гистонов, соединенных друг с другом при помощи своих гидрофобных участков. Основная часть нуклеосомы представляет собой диск диаметром 11 нм и толщиной 5,7 нм (рис. VI). Участок ДНК в виде спирали диаметром 9 нм и шагом 2,8 нм навивается на белковое ядро. Основные части нуклеосом соединены между собой участками ДНК, не входящими в состав основных частей.

Помимо ядерной ДНК, эукариотические клетки содержат небольшое количество цитоплазматической

ДНК, т. е. ДНК, которая располагается в цитоплазме, за пределами ядра. Эта ДНК называется внеядерной. На долю внеядерной ДНК приходится около 0,1—0,2 % всей клеточной ДНК. Внеядерная ДНК отличается от ядерной составом азотистых оснований и молекулярной массой. Она находится в митохондриях — постоянно присутствующих внутриклеточных органоидах, участвующих в преобразовании энергии в клетке.

Небольшое количество ДНК содержат некоторые пластиды растительных клеток, в частности хлоропласты, — пластиды, имеющие хлорофилл и участвующие в процессе фотосинтеза.

В клетке бактерии находится единственная молекула ДНК. На ее долю приходится около 1 % массы клетки. Ядра, как такового, у бактерий нет, и поэтому молекула ДНК у них локализована в так называемой ядерной зоне. Она часто прикреплена к мезосоме — выпячиванию клеточной мембраны. В бактериальной клетке ДНК не связана с белками.

У некоторых бактерий в цитоплазме находятся молекулы внехромосомной ДНК, называемые плазмидами. Эти молекулы по размерам значительно меньше хромосомы.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

При нагревании ДНК денатурирует, т. е. разрушается. Денатурация двух цепочек ДНК происходит при температуре выше 90 °С, а *инактивация* (частичное разрушение) начинается при температуре 85 °С.

При нагревании раствора ДНК и одновременном регистрировании оптической плотности раствора при длине волны 260 нм при определенной температуре произойдет резкое увеличение поглощения света раствором. Наблюдается так называемый гиперхромный эффект. Температура, при которой наблюдается гиперхромный эффект, называется температурой плавления. Гиперхромный эффект при температуре плавления связан с тем, что происходит разрыв водородных связей и нарушается упорядоченность молекулы ДНК. Понятие температуры плавления в отношении ДНК связывают с кристаллическим состоянием молекулы ДНК до соответствующей температуры и нарушением упорядоченной структуры при нагревании выше температуры плавле-

ния. Характер дифракции рентгеновских лучей также указывает на кристаллическое строение дезоксирибонуклеиновой кислоты.

При действии ультрафиолетового света на молекулы ДНК бактериальных клеток происходит разрыв однонитевой ДНК, что связывают с образованием пероксида водорода под действием ультрафиолетовых лучей. Пероксид водорода в качестве вторичного продукта приводит к повреждению молекулы ДНК. Наряду с этим при действии ультрафиолетового света наблюдается синтез бактериальными клетками новых белков, одним из которых является каталаза. Каталаза инактивирует пероксид водорода, и поэтому такой синтез можно считать приспособительным, т. е. направленным на приспособление к выживанию в неблагоприятных условиях окружающей среды. Следовательно, ДНК устроена так, что реагирует на повреждающее воздействие не только разрывом нити нуклеотидов, но и компенсаторной (приспособительно-возмещающей) реакцией — синтезом фермента каталазы, действие которого направлено против повреждающего фактора, по крайней мере против непосредственного виновника повреждения — пероксида водорода.

ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ГЕНЕ

Ген — это элементарная единица наследственности, представляющая собой определенную специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК.

В хромосомах диплоидных организмов гены расположены парами. Хромосома разделена на участки — локусы. *Локус* — это место расположения того или иного гена в хромосоме. Сам ген состоит из двух или нескольких аллелей. Как отмечалось ранее, *аллель* — это один или несколько вариантов гена, которые могут находиться в данном локусе хромосомы. Таким образом, аллель представляет собой состояние гена, определяющее развитие данного признака.

Если локус имеет один аллель А, то возможно формирование только одного генотипа АА. Для локуса с двумя аллелями A_1 и A_2 уже существует четыре комбинации: A_1A_2, A_2A_1, A_1A_1 и A_2A_2. Так как генотипы A_1A_2 и A_2A_1 идентичны, то в такой ситуации возможны три генотипа: A_1A_2, A_1A_1 и A_2A_2. Для локусов с тремя, четырьмя и большим числом аллелей, например n, число

генотипов определяется выражением $\frac{n^2+n}{2}$, например тремя аллелями $\frac{3^2+3}{2}=\frac{9+3}{2}=6$, а именно A_1A_1, A_1A_2, A_1A_3, A_2A_2, A_2A_3 и A_3A_3.

Общее число генов в клетке высших организмов составляет около 100 000. Каждому гену соответствует свой белок. Структурные гены в геноме расположены в такой последовательности, в какой действуют образующиеся под их контролем ферменты. Структурными гены называются так потому, что они определяют структуру ферментов. Например, синтез аргинина происходит в четыре этапа, каждый из которых контролируется определенным ферментом. Вся последовательность ферментов закодирована в ДНК в виде генов в той же последовательности.

В генах закодирована генетическая информация, единицей которой является *кодон* — группа из трех последовательных нуклеотидов, иначе называемая триплетом.

У прокариот, например бактерий, полипептидные цепи кодируются непрерывной последовательностью триплетных кодонов. Прокариоты — это организмы, у которых нет оформленного ядра и которые не претерпевают деления по типу мейоза, характеризующегося уменьшением числа хромосом вдвое.

В 1977 г. было открыто, что гены эукариот — организмов с оформленным ядром представляют собой мозаику из транслируемых и нетранслируемых участков в последовательности ДНК. Например, ген ß-цепи *гемоглобина* — белка крови — прерывается в области, кодирующей аминокислотную последовательность, длинной некодирующей вставочной последовательностью из 550 пар оснований и короткой последовательностью из 120 пар оснований. Следовательно, ген ß-глобина разделен на три кодирующие последовательности. Такая структура была обнаружена при проведении электронно-микроскопического исследования гибридов между ß-глобиновой *и*РНК и фрагментом ДНК мыши, содержащим ген ß-глобина (рис. VII). Двухцепочечную ДНК частично денатурировали, что позволило *и*РНК гибридизоваться с одной из цепочек ДНК. Одноцепочечный участок ДНК образует петлю. Если бы ген ß-глобина был непрерывен, была бы видна одна петля. Однако на электронных микрофотографиях были видны

три петли. Это возможно только в том случае, когда ген прерывается по крайней мере одним участком ДНК, которого нет в соответствующей *и*РНК. Подтверждения этому заключению были получены и другими методами исследования.

Многие гены, по крайней мере у прокариот, входят в состав оперона (рис. 2). *Оперон* — это группа генов, определяющая синтез функционально связанных ферментов. В него входят структурные и другие гены, например, *ген-регулятор*, который с небольшой, но постоянной скоростью обеспечивает синтез специфического белка, называемого *репрессором*. Этот белок обладает сильным сродством к гену-оператору и может легко присоединяться к нему. *Ген-оператор* управляет функционированием структурных генов. Он как бы то включает их, то выключает. При связывании гена-оператора с белком-репрессором работа структурных генов прекращается.

Для прикрепления РНК-полимеразы служит *ген-промотор*. Как только к нему присоединяется РНК-полимераза, начинается транскрипция со структурных генов. К гену-промотору присоединяется также комплекс циклического аденозинмонофосфата и специального белка реципиента. Этот комплекс необходим для транскрипции оперона.

У эукариот гены могут быть собраны вместе и повторяться тандемно много раз. Например, так организованы в геноме многократно повторяющиеся гены, ко-

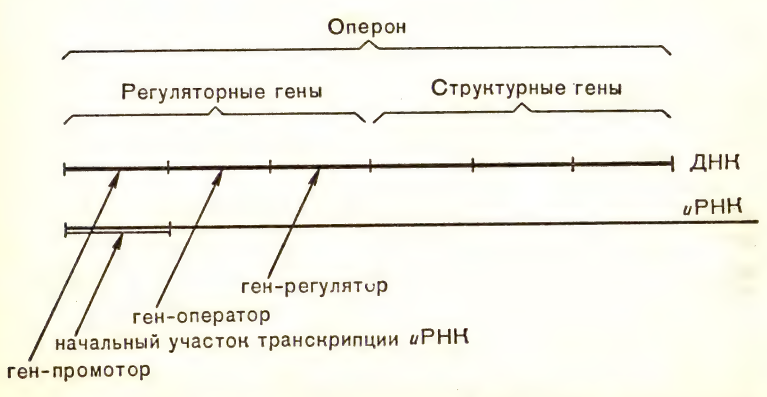


Рис. 2. Схема транскрипции генетической информации информационной РНК с оперона у прокариотов.

дирующие белки, в частности гены, кодирующие гистоны — самые простые вещества в группе белков. При расщеплении рестриктазой ДНК, кодирующий гистоны, получались фрагменты длиной 7 тысяч пар оснований, которые гибридизировались с гистоновой *и*РНК. Затем ученые клонировали гибридные фрагменты в бактериальных клетках кишечной палочки и исследовали с помощью ферментов и электронной микроскопии. Оказалось, что гены, кодирующие пять основных гистонов, сгруппированы вместе в составе основного повторяющегося элемента длиной 7 тысяч пар оснований (рис. XI). В этом повторяющемся элементе пять кодирующих участков чередуются с пятью спейсерами. Кодирующие последовательности гистонов в отличие от других генов эукариот не прерываются вставочными последовательностями. Группы из пяти гистоновых генов повторяются много раз.

Долгое время считалось, что генетический аппарат клетки неподвижен, фиксирован и все гены занимают в нем строго определенное положение. Однако ряд данных не согласовывался с этим положением. Еще в конце 40-х годов Б. Макклинток (США) получила на кукурузе ряд мутаций, которые она объяснила наличием генетических элементов, меняющих свое место в ДНК. Это положение было настолько революционно, что к нему отнеслись вначале с большим недоверием. Тем более что полученные автором экспериментальные данные были только косвенными. Позднее подвижные гены были обнаружены у бактерий.

Сейчас считается, что и в клетках животных не все гены строго фиксированы — среди них также существуют подвижные гены, которые играют важную роль в эволюционном процессе. С подвижными генами, возможно, связано и возникновение злокачественных опухолей.

Ген важен еще тем, что он ответствен за проявление действия мутаций. *Мутация* — это внезапно возникшее изменение генетической информации, обусловленное изменением структуры кодирующей ее молекулы ДНК. Мутации, в зависимости от точки приложения, могут изменить внешние признаки организма, его физические особенности, биохимические и биофизические процессы, нарушить развитие, ослабить жизнеспособность организма или даже привести его к гибели. Чаще всего мутации сопровождаются неблагоприятными по-

следствиями. Генные мутации являются причиной развития некоторых болезней, например серповидно-клеточной анемии.

На примере плесневого гриба микроспоры было показано, что если в результате мутации, вызывающей повреждение гена, не образуется фермент, принимающий участие в биосинтезе химического вещества, необходимого клетке, то микроспора не растет на среде, не содержащей данного химического вещества. Следовательно, в результате изменения физико-химических свойств нуклеиновых кислот мутация приводит к нарушению структуры гена, что проявляется в изменении обмена веществ в клетке, в данном случае в микроспоре.

Явление мутации лежит в основе эволюции и селекции живых организмов. В результате репликации ДНК наследственные признаки передаются потомству, но только мутации обеспечивают возникновение какого-либо нового признака. И уже затем этот новый признак передается по наследству.

Для изучения мутаций и их последствий в отношении организма используют вещества, которые искусственно вызывают мутации. Вещества, вызывающие мутации, называются *мутагенами*. К таким веществам относятся, например, соединения из группы акридинов. Акридины состоят из трех расположенных рядом углеводородных колец, что определяет их окрашивающие и мутирующие свойства. В частности, к акридинам относится вещество акрифлавин.

Если при репликации ДНК в окружающей среде находится акрифлавин, он может встраиваться в комплементарную цепь ДНК в процессе ее построения (рис. XII). Акрифлавин как бы закрывает одно из оснований на матричной цепи. Поэтому к месту, где располагается акрифлавин, ни одно основание при последующей, второй редупликации не присоединится (рис. XIII). Этот пробел сохраняется и при последующих репликациях. Так возникает мутация.

Такой же процесс возникновения мутаций может происходить и в природе. Встраивание соединения, с которым не связывается ни одно из оснований, приводит к тому, что данный участок ДНК становится как бы закрытым. Это приведет при последующем синтезе фермента к нарушению его структуры и функции. В зависимости от важности измененного участка белка

может произойти либо полная утрата ферментной функции данным белком, либо, что на самом деле чаще встречается, ухудшение функционирования такого фермента. Если такое ухудшение значительно, оно проявляется внешними признаками. Например, такое животное хуже бегает или имеет менее развитый шерстный покров. Неблагоприятные мутации приводят к тому, что эти животные погибают либо в результате того, что не способны убежать от хищника, либо от холода.

Учитывая роль мутагенов в изменении структуры нуклеиновых кислот, в СССР с 1976 г. введена обязательная проверка новых лекарств на мутагенность, которая приводится на экспериментальных животных и культурах клеток человека. Если препарат обладает мутагенными свойствами, то при последующем генетическом исследовании в клетках выявляются мутированные гены или дефекты в хромосомах. Такие лекарства или совсем не применяются, или применяются с учетом их особых лечебных свойств, например для замедления роста злокачественных опухолей. После лечения больной обязательно должен проконсультироваться у генетика.

Существуют и благоприятные мутации. Такие мутации приводят к тому, что замена, например, одной аминокислоты на другую сопровождается улучшением функционирования данного фермента. Такая мутация закрепляется в организме при последующем размножении вида.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

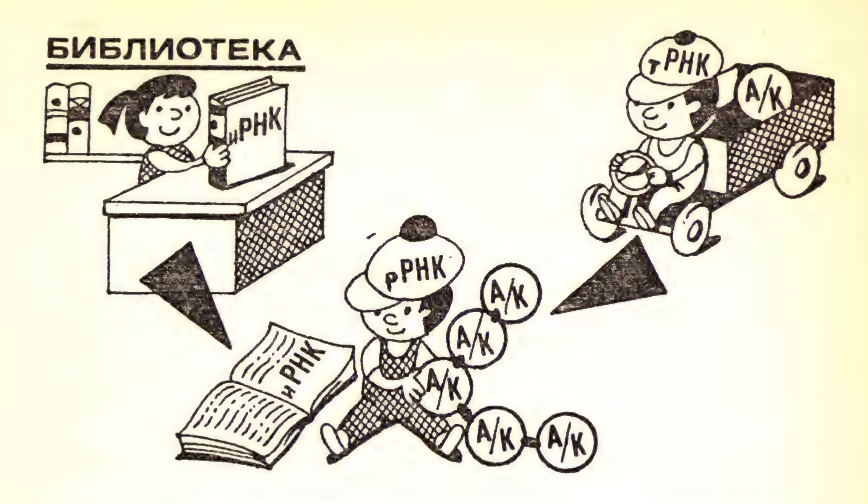
Генетический код — это система расположения нуклеотидов в нити ДНК, обусловливающая соответствующую последовательность расположения аминокислот в белке. Генетический код передается по наследству и определяет свойства организмов. Он может меняться в результате мутаций, которые бывают положительными и меняют его в сторону, благоприятную для организма, или, что бывает чаще, в неблагоприятную или даже губительную для конкретного организма.

Работы по расшифровке генетического кода проводились в основном на клетках бактерии кишечной палочки и были повторены на других видах бактерий, а также на организмах животных, включая человека, на растениях.

Информация, необходимая для синтеза любой полипептидной цепи, содержится в ДНК. У РНК-содержащих вирусов информация хранится в РНК. Последовательность нуклеотидов в цепи ДНК, т. е. ее первичная структура, обусловливает биологическую функцию ДНК в клетке. В последовательности нуклеотидов зашифрована вся наследственная информация данного биологического вида.

Нуклеиновые кислоты образованы чередованием нуклеотидов всего четырех типов, а белки построены из 20 аминокислот. Что лежит в основе соответствия между основаниями нуклеиновых кислот и аминокислотами белков? Если бы каждому азотистому основанию соответствовала только одна аминокислота, то в составе белков было бы всего четыре аминокислоты. Если бы для кодирования аминокислот было достаточно двух оснований, то кодирующая емкость нуклеотидов увеличилась бы до числа сочетаний из четырех по две и равнялась бы $4^2 = 16$ аминокислот, что также недостаточно для кодирования всех существующих в природе аминокислот. Комбинация из трех нуклеотидов может уже кодировать $4^3 = 64$ аминокислоты. 64 комбинации уже больше, чем число встречающихся реально 20 аминокислот. Поэтому предположили, что каждая группа из трех нуклеотидов, расположенных рядом в ДНК, кодирует одну аминокислоту. Такую группу из трех нуклеотидов назвали триплетом. В последующем были получены экспериментальные доказательства того, что каждый триплет кодирует одну и в редких случаях несколько аминокислот.

В результате транскрипции генетическая информация переходит из ДНК в *и*РНК, а *и*РНК обладает способностью фиксировать на каждом своем триплете (кодоне) одну аминокислоту. Присоединение аминокислоты к синтезируемой полипептидной цепи происходит последовательно. Движение в процессе синтеза начинается с N-концевой аминокислоты по мере продвижения рибосомы вдоль *и*РНК. Присоединение очередной аминокислоты к полипептидной цепи происходит в тот момент, когда кодирующий ее триплет находится в рибосоме. Но аминокислота в несколько раз меньше, чем кодирующий ее триплет. Следовательно, в клетке должна находиться система, предназначенная для специфического присоединения аминокислоты к *и*РНК. Оказалось, что существует *т*РНК, которая узнает триплет



на *и*РНК и транспортирует аминокислоту, осуществляя связь и корреляцию между аминокислотой и триплетом *и*РНК.

Генетический код, находящийся в хромосомах ядра, определяет расположение аминокислот в белковых цепях различных ферментов, структурных белков и некоторых белковых гормонов. Молекула ДНК, оказавшись полезной для передачи наследственных признаков организма, приобрела универсальное значение вещества наследственности для самых различных представителей органического мира, начиная от вирусов и заканчивая человеком.

Таким образом, ДНК несет в себе генетический код, представляющий собой комбинацию из нуклеотидов и обеспечивающий построение специфической последовательности аминокислот в белках.

РЕПЛИКАЦИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Любое деление клетки связано с репликацией. *Репликация* — это создание себе подобной структуры, что позволяет точно воспроизводить генетическую информацию. Копирование ДНК с образованием идентичных дочерних молекул является первым по времени событием в передаче наследственной информации от ДНК в цитоплазму клетки для синтеза соответствующих белков. Репликация заключается в том, что на каждой из нитей молекулы ДНК синтезируется парная ей нить

новой ДНК. В процессе репликации происходит разделение двух цепочек молекулы ДНК и синтез двух новых, дочерних цепочек ДНК. Такой процесс возможен вследствие комплементарности двух цепей идентичных по структуре и последовательности нуклеотидов родительской молекуле ДНК и содержащих одну цепь из родительской молекулы, а другую — вновь синтезированную цепь ДНК.

Большинство клеток возникает в результате деления материнской клетки. При этом дочерние клетки наследуют свойства материнской. Свойства клетки определяют в основном ее белки. Нуклеиновые кислоты обеспечивают синтез белков в дочерних клетках точно так же, как и в материнской клетке. Репликация лежит в основе передачи наследственной информации, которая осуществляется на двух уровнях: клеточном и организменном.

Генетическая информация передается преимущественно с помощью ДНК. Установить такой способ передачи наследственной информации помогла серия опытов с микроорганизмами разных штаммов. *Штамм* — это чистая культура микроорганизмов данного вида, выделенная из определенного источника и обладающая особыми физико-химическими свойствами. Доказательством передачи информации служат трансформация и трансдукция.

Трансформация — это включение в клеточную ДНК чужеродной ДНК с изменением в результате этого наследственных свойств клетки. Трансформация хорошо изучена на пневмококках. *Пневмококки* — это бактерии, окруженные слизистой блестящей полисахаридной капсулой и вызывающие заболевание пневмонию — воспаление легких. Каждая молекула капсульного полисахарида состоит из чередующейся последовательности глюкозы и глюкуроната. Бактерии, имеющие такую капсулу, способны вызывать болезнь. Их обозначают буквой *S* (англ. smooth — гладкий), так как они образуют гладкие колонии при выращивании на питательных средах. Мутанты, не имеющие капсулу, не вызывают болезнь. Их обозначают буквой *R* (англ. roogh — шероховатый), так как они образуют при выращивании шероховатые колонии. У *R*-мутантов отсутствует фермент дегидрогеназа, превращающая глюкозу в глюкуронат. Без глюкуроната невозможен синтез капсульного полисахарида. Было установлено, что непатогенный *R*-

мутант можно трансформировать в патогенную *S*-форму путем передачи фактора, содержащего ДНК. Если с помощью шприца ввести мышам смесь живых бактерий *R*-формы и убитых нагреванием пневмококков *S*, то эта смесь вызывает гибель мышей, хотя ни живые *R*-пневмококки, ни убитые нагреванием *S*-пневмококки, введенные по отдельности, животных не убивают. Более того, при анализе было установлено, что кровь погибших мышей содержала живые *S*-пневмококки. Это изменение было стабильным: трансформированные пневмококки давали патогенное потомство *S*-формы из поколения в поколение. Затем было показано, что трансформация может происходить и при предварительном смешивании двух форм пневмококков в пробирке. Смешивали живые *R*-формы и бесклеточный экстракт убитых нагреванием пневмококков *S*. После смешивания некоторые клетки в растущей культуре *R*-формы трансформировались в *S*-форму. В последующем в многочисленных экспериментах было доказано, что трансформирующим фактором является ДНК.

Бактерии передают ДНК путем конъюгации, т. е. путем образования непосредственных межклеточных контактов. Перенос бактериями генетического материала обусловлен некоторыми плазмидами. Процесс конъюгации был открыт в 1946 г. Д. Ледербергом и Э. Татумом. При конъюгации клеток кишечной палочки один партнер служит донором генетического материала, другой — реципиентом. Доноры содержат плазмиду, называемую фактором *F* (англ. fertility — плодовитость), который несет гены, определяющие образование компонентов, участвующих в конъюгации. При конъюгации одна цепь плазмиды фактора *F* разрывается и происходит раскручивание двухцепочечной молекулы (рис. VIII). 5′-конец разорванной цепи входит в реципиентную клетку, и на ней синтезируется комплементарная цепь. При этом образуется замкнутая кольцевая двухцепочечная молекула. Присутствие плазмиды фактора *F* в реципиентной клетке (первоначально F^-) превращает ее в клетку F^+. Такая клетка может спонтанно терять свой фактор и переходить таким образом к генотипу F^-.

Трансдукция — это перенос части молекулы ДНК одних бактерий другим с помощью вируса.

Например, при заражении неподвижных бактерий вирусом, который размножался ранее в культуре по-

движных бактерий, часть из неподвижных бактерий приобрела подвижность. Трансдукция указывает на то, что изменение наследственной информации произошло благодаря переносу ДНК бактерий с помощью ДНК или РНК вирусов.

Описана трансдукция и у насекомых. Например, при заражении неокрашенных личинок тутового шелкопряда вирусом, ранее размножавшимся в окрашенных насекомых, у части потомства появилась окраска. Изменение наследственных свойств здесь также связано с переносом вирусом ДНК бывшего хозяина.

Убедительные доказательства переноса наследственной информации с помощью ДНК были получены при изучении вирусов. Вирусную ДНК присоединяли к клеточной ДНК. Вся белковая оболочка вируса оставалась снаружи за пределами клетки. Введение вирусной ДНК давало новое поколение вирусов. Следовательно, не белковая составляющая, а нуклеиновая кислота ответственна за хранение и передачу наследственной информации.

Другими работами, доказывающими передачу наследственной информации с помощью нуклеиновых кислот, явились эксперименты, в которых для заражения растений использовали чистую нуклеиновую кислоту вируса табачной мозаики. Этот вирус вызывает болезнь растения табака. Он представляет собой РНК, заключенную в белковую оболочку, причем молекула РНК непосредственно соприкасается с этой оболочкой. Внешне вирус табачной мозаики имеет форму продолговатой палочки. При заболевании листья табака, пораженные вирусом, становятся пестрыми, мозаичными. Отсюда и возникло название болезни и самого вируса.

Введение растениям очищенной нуклеиновой кислоты вируса табачной мозаики вызывает типичную картину заболевания, как и при заражении листьев табака непосредственно вирусом. Более того, если выделенную очищенную нуклеиновую кислоту расположить в оболочке вируса другого типа и заразить такими гибридными вирусами клетку, то новое поколение вируса будет соответствовать тому типу, от которого была взята нуклеиновая кислота.

Передача наследственной информации от клетки к клетке осуществляется в процессе митоза. Митоз — это непрямое деление клетки при удвоении числа хромосом. Он происходит в несколько фаз, которые сле-

дуют друг за другом. Делению клетки предшествует удвоение нитей ДНК, из которых состоят хромосомы. Плотно упакованная, компактная структура хромосомы в интерфазном, т. е. неделящемся ядре должна сильно разрыхляться, чтобы спираль ДНК могла беспрепятственно удваиваться. После удвоения ДНК начинают конденсироваться в компактные образования. Как только начинается деление, хромосомы в ядре клетки становятся хорошо видны в световой микроскоп. Так как нити ДНК предварительно удвоились, каждая хромосома представлена в виде пары нитей. Затем каждая хромосома из пары попадает в свою клетку. Весь процесс митоза делится условно на несколько этапов. В профазе становятся видны удвоенные тельца. В прометафазе хорошо видны характерные особенности каждой хромосомы — их размеры и форма, а также число хромосом. Метафаза характеризуется расположением парных хромосом в экваториальной плоскости ядра. Расхождение хромосом к полюсам клетки осуществляется в анафазе. В телофазе происходит деконденсация хромосом. И такой цикл повторяется при каждом делении клетки.

Особый случай деления клетки представляет собой мейоз, при котором происходит образование гаплоидного набора хромосом, т. е. уменьшение числа хромосом в 2 раза по сравнению с количеством хромосом, находящимся в обычной клетке. Во время мейоза хромосомы удваиваются только один раз, а деление происходит два раза.

Эффект мейоза заключается в перераспределении геномов, в результате чего появляются новые комбинации хромосом. Поскольку мужские и женские хромосомы почти никогда не имеют полностью одинаковых генов, то теперь в одном ядре могут оказаться гены, которые до слияния половых клеток находились в разных ядрах. Таким образом, суммарная генетическая информация меняется. Происходит рекомбинация целых хромосом: гены, находящиеся в одной хромосоме, остаются сцепленными вместе (рис. XIV).

Кроме того, при мейозе происходит перестройка самих хромосом на молекулярном уровне. На первой стадии мейоза хромосомы разделяются на две половинки — хроматиды. Таким образом, при мейозе соединяются не две целые хромосомы (одна мужская и одна женская), а 4 хроматиды (2 мужских и 2 женских).

Каждая пара хромосом представляет собой 4 хроматиды. В световой микроскоп на определенном этапе мейоза можно наблюдать перекрест между хроматидами. Такой перекрест называется *хиазмой* (рис. XV). Хиазма разрывается в процессе кроссинговера, в результате чего происходит взаимный обмен частями между парными хромосомами. Происходит перераспределение генетической информации между отдельными хромосомами.

Итак, между любыми двумя хромосомами в клеточном ядре может произойти обмен участками ДНК.

Число хромосом у разных видов значительно варьирует. Так, у аскариды имеется всего 2 хромосомы, у плодовой мушки дрозофилы — 8, у гороха — 14, у гориллы — 48, у ящерицы — 140, а у десятиногого рачка — 208 хромосом. Число хромосом является строго постоянной величиной для каждого вида живых существ.

Существует такое важное понятие, как половые хромосомы, по внешнему виду которых можно определить, к какому полу относится данная клетка и весь организм в целом. У женщин 23-я пара также гомологичная — это две так называемые X-хромосомы (икс-хромосомы). У мужчин же 23-я пара представлена X- и Y-хромосомами, т. е. одна из хромосом имеет вид буквы «Y». Наборы хромосом мужчины и женщины отличаются по внешнему виду половых хромосом.

Таким образом, репликация ДНК по существу представляет собой биосинтез ДНК. Биосинтез ДНК начинается с образования динуклеотидов из различных нуклеотидов. Образование динуклеотида осуществляется путем связывания двух дезоксирибонуклеотидов фосфатным мостиком.

Важным моментом в биосинтезе ДНК является создание второй параллельной нити ДНК. В процессе биосинтеза ДНК происходит образование связей не только между мононуклеотидами в одной ее цепи, но и между нуклеотидами, расположенными в параллельных нитях ДНК.

Глава 4

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Рибонуклеиновые кислоты повсеместно распространены в живой природе. Они находятся во всех микроорганизмах, растительных и животных клетках и являются носителями наследственной информации во многих вирусах. С чем это связано? Почему РНК, как и ДНК присутствует во всех клетках?

Биологическая функция РНК обусловлена тем, что они обеспечивают реализацию в клетке наследственной информации, которая передается с помощью ДНК.

В клетке существует три главных типа РНК: информационная РНК (*и*РНК), рибосомная РНК (*р*РНК) и транспортная РНК (*т*РНК). Рибосомная РНК составляет около 80—82 % от содержания суммарной клеточной РНК, *т*РНК — 15—16 % и *и*РНК — 2—10 %. В некоторых клетках содержание *и*РНК относительно общей массы РНК составляет тысячные доли процента.

В отличие от ДНК молекулы всех трех типов РНК одноцепочечные, что является одной из важных особенностей РНК. Содержание РНК в клетке в пересчете на массу в 5—10 раз выше, чем ДНК. Каждый из типов РНК характеризуется определенным нуклеотидным составом, что определяет их свойства. Они имеют также различную молекулярную массу.

В бактериальной клетке почти вся РНК расположена в цитоплазме. В клетках высших организмов часть РНК находится в различных органеллах.

РНК входит в состав всех вирусов растений, в частности вируса табачной мозаики, некоторых вирусов бактерий, например бактериофаг Q_β кишечной палочки, и некоторых вирусов животных, например, вируса полиомиелита.

Все типы РНК принимают участие в синтезе белка. Первый этап переноса генетической информации с ДНК в клетку заключается в том, что генетическая информация в виде последовательности нуклеотидов ДНК вводится в последовательность нуклеотидов *и*РНК. Информационная РНК передает эту информацию в последовательность аминокислот соответствующей белковой молекулы. Этой белковой молекулой может быть фермент, антитело, структурный белок клеточной мембраны, белок-медиатор или гормон.

Было замечено, что начало синтеза белка в клетках совпадает с увеличением количества и скорости обновления РНК в цитоплазме клетки. Впоследствии было показано, что, прежде чем синтезируются полипептидные (белковые) цепи, осуществляется синтез РНК, и в первую очередь *и*РНК и *т*РНК. Биосинтез РНК происходит в ядрышковой зоне ядра клеток. Он связан с внутриядрышковым хроматином. Нельзя исключить, что этот хроматин является видимым проявлением действующей ДНК. Отработав в одном месте, ядрышко смещается на другое, что означает включение других участков ДНК в процесс синтеза *и*РНК. Последовательность монорибонуклеотидов в цепи РНК определяется последовательностью азотистых оснований в цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Образование функционально активных молекул РНК, которое продолжается после завершения транскрипции, называется *процессингом.* У прокариот молекулы *т*РНК и *р*РНК образуются путем расщепления и химического изменения определенных новосинтезированных цепей РНК. Например, у бактерий кишечной палочки три вида молекул *р*РНК и одна молекула *т*РНК вырезаются из первичной РНК. Первичная РНК содержит разграничивающие участки (рис. XVI). Другая первичная РНК содержит несколько различных видов *т*РНК или несколько копий одной и той же *т*РНК. Существуют ферменты — нуклеазы, которые расщепляют и укорачивают эти предшествующие *р*РНК и *т*РНК. Например, рибонуклеаза Р образует правильные 5′-концы всех молекул *т*РНК в клетке кишечной палочки. Рибонуклеаза III вырезает предшественники *р*РНК из первичной РНК и расщепляет определенные связи в двухспиральных шпилечных областях.

Другим типом процессинга является присоединение нуклеотидов к концам некоторых РНК. Третьим типом

процессинга является изменение оснований и рибозных остатков.

Таким образом, если без ДНК невозможна передача наследственной информации от клетки к клетке, то без РНК невозможна расшифровка и, следовательно, реализация этой информации, которая закодирована в ДНК. ДНК и РНК в функциональном отношении дополняют друг друга.

СТРУКТУРА РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нить РНК — это последовательность рибонуклеотидов, соединенных в одну цепь. РНК имеет линейную структуру молекулы с огромным числом входящих в нее составляющих элементов. Рибонуклеотиды соединены так, что образуют неразветвленную нить большой длины. Соединение рибонуклеотидов между собой осуществляется эфирной связью между 5′-фосфатом одного нуклеотида и 3′-гидроксилом рибозы следующего нуклеотида. Образуется 5′-, 3′-фосфодиэфирная связь между двумя соседними рибонуклеотидами. Условно для ориентировки конец цепи РНК, который заканчивается 5′-гидроксильной группой, называют 5′-концом РНК, а конец цепи РНК, который заканчивается 3′-гидроксильной группой, называют 3′-концом РНК. Этот конец может оставаться свободным или быть фосфорилированным за счет присоединения на конец цепи фосфорной кислоты.

Углеводный компонент РНК представлен рибозой. Так как рибоза относится к классу пентоз, то с этим было связано и первоначальное название РНК — пентозонуклеиновые кислоты. Но такое название не закрепилось в терминологии, так как пентозы — это широкий класс соединений, а рибоза является всего лишь их частным случаем. В РНК же содержится из всего класса пентоз только рибоза.

Азотистыми основаниями РНК являются аденин и гуанин из класса пуриновых оснований и цитозин и урацил из класса пиримидиновых оснований. В очень небольших количествах в РНК встречаются минорные основания; особенно это относится к *т*РНК.

Азотистые основания присоединяются к первому углеродному атому пентозы. Пуриновые основания присоединяются к пентозе через атом азота, находящийся в 9-м положении пуринового кольца, а пиримидиновые

азотистые основания — через атом азота, находящийся в 3-м положении.

Отличительной особенностью РНК от ДНК является то, что для нее не характерно устойчивое спиральное строение.

В состав РНК может входить от нескольких десятков до нескольких тысяч рибонуклеотидов. Число нуклеотидов в цепи зависит от вида РНК и может варьировать в больших пределах. Молекулярная масса РНК колеблется от 10^4 до 10^6.

Синтез РНК из рибонуклеотидов катализируют РНК-полимеразы или, как их еще называют, нуклеотидилтрансферазы — ферменты из класса трансфераз. РНК-полимеразы обнаружены во всех живых организмах. Они могут состоять из нескольких субъединиц, например РНК-полимераза кишечной палочки состоит из 5 субъединиц. Для ее функционирования необходима также σ-частица, которая осуществляет связь фермента с промотором матричной ДНК. В клетках эукариот существуют три формы РНК-полимераз: ядрышковая, митохондриальная и нуклеоплазматическая.

Структура РНК определяется последовательностью рибонуклеотидов. Эта последовательность рибонуклеотидов в цепи называется первичной структурой РНК. Первичная структура строго специфична и уникальна для каждого вида РНК. Первичная структура РНК представляет собой своеобразную запись биологической информации, закодированную в РНК определенным набором рибонуклеотидов, и определяет вторичную структуру, которая проявляется в закручивании нити РНК в спираль. Третичная структура также определяется первичной структурой и представляет собой пространственное расположение всей молекулы РНК. Третичная структура включает вторичную структуру и те фрагменты полинуклеотидной цепи, которые соединяют один участок вторичной структуры с другим. Это взаиморасположение и связь фрагментов РНК.

Вторичная и третичная структуры РНК формируются преимущественно за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий между азотистыми рибонуклеиновыми основаниями. Термин «гидрофобный» означает, что данное вещество или группа элементов в одном из участков молекулы отталкивает воду. Термин «гидрофильный» применяют по отношению к веществу или группе элементов, притягивающих воду. Молекулы

гидрофобного вещества воздействуют силами электронного притяжения на молекулы углеводородов. От количества и расположения водородных связей и контактов гидрофобного взаимодействия зависит пространственное расположение (конфигурация) всей молекулы рибонуклеиновой кислоты.

Многие РНК входят в состав *нуклеопротеидов* — комплексов белков с нуклеиновыми кислотами. Из рибонуклеопротеидов состоят многие вирусы, например вирус табачной мозаики.

ИНФОРМАЦИОННАЯ РИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА

Информационная РНК программирует синтез белков клетки. Несмотря на относительно низкое процентное содержание в общей массе РНК клетки, *и*РНК по значению стоит на первом месте. Информационная РНК осуществляет непосредственную передачу кода ДНК для синтеза клеточных белков.

Соответственно тому, что молекулы *и*РНК используются для синтеза разных белков, они представлены многими видами, которые, естественно, отличаются по своей последовательности нуклеотидов и молекулярной массе. Каждый белок клетки кодируется специфической *и*РНК или специфическим участком этой молекулы. Каждый белок требует соответствующей ему *и*РНК. Поэтому *и*РНК характеризуются значительной разнородностью. Эта группа разных по размеру молекул, масса которых может колебаться от 10^4 до $2 \cdot 10^6$.

Биосинтез *и*РНК осуществляется в ядре в процессе транскрипции. В ходе транскрипции строится нуклеотидная последовательность *и*РНК, соответствующая нуклеотидной последовательности одной из цепей ДНК хромосомы. Транскрипция осуществляется ферментативным путем. По сути дела, транскрипцию можно представить как перевод генетической информации, заключенной в последовательности нуклеотидов ДНК, в последовательность нуклеотидов *и*РНК. Отличие от биосинтеза ДНК здесь заключается в том, что строится одиночная нить *и*РНК. Азотистые основания *и*РНК комплементарны азотистым основаниям ДНК соответствующего участка, с которого происходит переписывание генетической информации. После окончания транскрипции *и*РНК переходит на рибосомы, где с нее

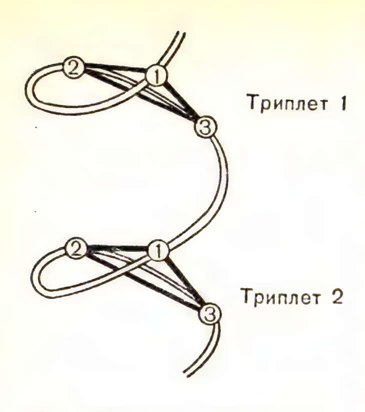


Рис. 3. Геометрическое расположение нуклеотидов в триплете *и*РНК. Цифрами обозначены отдельные нуклеотиды триплетов.

происходит считывание информации в последовательность аминокислот растущей полипептидной цепи. Последовательность триплетов *и*РНК определяет последовательность аминокислот в растущей цепи белка. Если вначале матрицей для синтеза *и*РНК служила ДНК, то теперь *и*РНК сама служит матрицей для построения белковой цепи. Поэтому существует еще одно название *и*РНК — матричная РНК (рис. 3).

Отличительной особенностью *и*РНК от *р*РНК и *т*РНК является то, что *и*РНК обладает низкой устойчивостью в процессе обмена веществ — *и*РНК является относительно маложивущей молекулой. Еще одной характерной особенностью *и*РНК является наличие в ней участка полиадениловой кислоты, состоящей из десятков и даже сотен рибонуклеотидов, в составе которых находится одно и то же азотистое основание — аденин. Полиадениловая кислота присоединена к 3′-концу молекулы *и*РНК. Между 3′-концом *и*РНК и полиадениловой кислотой возникает ковалентная связь.

Некоторые отдельные нуклеотиды являются регуляторами процесса транскрипции *и*РНК. Так, при уменьшении количества внутриклеточного нуклеотида — циклического аденозинмонофосфата — транскрипция *и*РНК подавляется. Это приводит к торможению синтеза белка.

В клетках прокариот, в частности бактерий, процессы транскрипции и трансляции взаимосвязаны, поскольку осуществляются в непосредственной пространственной близости.

Процесс переноса генетической информации с ДНК в цитоплазму клетки у эукариот несколько отличается. Основное отличие заключается в том, что в клетках животных процесс транскрипции *и*РНК и трансляции информации с *и*РНК пространственно разделены. Процесс транскрипции, т. е. биосинтез *и*РНК на исходной ДНК, локализован в ядре клеток, а трансляция происходит в цитоплазме. Кроме того, хромосомы эукариот

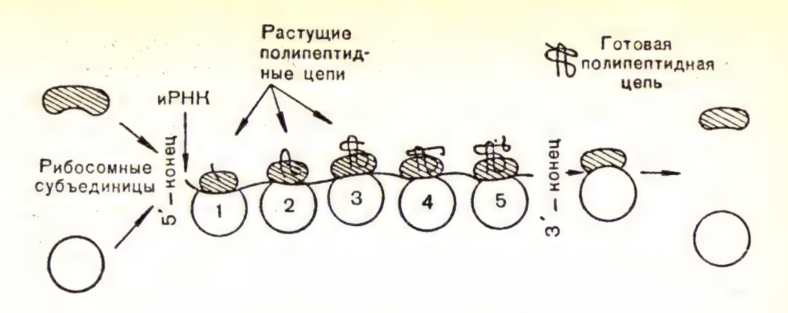


Рис. 4. Механизм функционирования полирибосомы. Синтез белка на рибосомах происходит независимо друг от друга. Каждая рибосома, перемещаясь вдоль цепи *и*РНК, синтезирует свою полипептидную цепь самостоятельно.

содержат, помимо ДНК, также некоторое количество РНК и белка.

Практически вся цитоплазматическая *и*РНК, особенно животных клеток, локализована в составе рибосом, которые образуют группы, называемые полирибосомами или просто полисомами. Таким образом, в состав полисом входит *и*РНК и группа рибосом. К *и*РНК присоединены рибосомы, на которых осуществляется синтез белка (рис. 4). Происходит считывание, или, как говорят, трансляция, генетической информации с *и*РНК. Так как трансляция происходит последовательно по всей длине молекулы *и*РНК, то на каждой рибосоме находится белок на различной стадии завершения биосинтеза.

ТРАНСПОРТНАЯ РИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА

Транспортная РНК относится к низкомолекулярным типам РНК, молекулярная масса которых колеблется от 23 000 до 30 000, так как в составе *т*РНК находится от 75 до 90 рибонуклеотидов. Другие типы РНК имеют гораздо большие размеры. В связи с небольшой молекулярной массой *т*РНК легко отделяются от других типов РНК с помощью различных методов франкционирования. Удобство выделения и относительно простая структура (состоит из небольшого числа рибонуклеотидов) привели к тому, что *т*РНК является наиболее изученной молекулой белоксинтезирующей системы.

Основной функцией *т*РНК является транспорт аминокислоты на соответствующий участок *и*РНК в поли-

сомах. Транспортная РНК как бы выполняет функцию автомобиля, подвозящего строительный материал к возводящемуся зданию белка.

Многие тРНК выделены в более или менее чистом виде в гомогенном состоянии, некоторые из них получены в кристаллическом виде.

Для многих тРНК изучена полная последовательность нуклеотидов в цепи молекулы.

Первой отличительной особенностью тРНК является то, что в их состав входит значительное количество минорных оснований. Содержание минорных оснований доходит до 10 % от общего числа оснований тРНК.

Второй отличительной особенностью тРНК является то, что в их структуру входят необычные мононуклеотиды, например псевдоуридиловая или риботимидиловая кислоты:

псевдоуридиловая кислота

риботимидиловая кислота

В псевдоуридиловой кислоте гликозидная связь находится в положении 5 урацила, а не в обычном положении 3. Риботимидиловая кислота — минорный нуклеотид, поскольку в норме тимин — это компонент не РНК, а ДНК.

Третьей характерной особенностью тРНК является то, что все они на одном конце имеют последним нуклеотидом остаток гуаниловой кислоты, которая содержит добавочную фосфатную группу. Эта группа находится при 5′-гидроксильной группе. На другом конце полинуклеотидной цепочки тРНК находятся три нуклеотида: цитозин-цитозин-аденин. Общая структура тРНК представлена в виде последовательности гуанин$_{75-90}$-цито-

зин-цитозин-аденин-ОН. Цифрами отмечено приблизительное количество мононуклеотидов, входящих в состав *т*РНК.

К последовательности нуклеотидов ЦЦА молекулы *т*РНК к свободной 2′- или 3′-гидроксильной группе концевого остатка адениловой кислоты присоединяется специфическая в отношении данной *т*РНК α-аминокислота. Такое присоединение аминокислоты осуществляется через образование связи между карбоксильной группой этой аминокислоты и 3′-гидроксильной группой концевого остатка адениловой кислоты, находящейся на конце одной из полипептидных цепей *т*РНК. Процесс, в результате которого происходит образование сложноэфирной связи, называется *этерификацией*. Этерификация протекает под действием ферментов. В результате этой реакции образуется активная форма аминокислоты, называемая аминоацил-*т*РНК:

$$Г_{75=90}ЦЦА{-}O{-}\underset{\overset{\|}{O}}{C}{-}CH(NH_2)\,R$$

Молекула *т*РНК имеет L-образную форму (рис. XVIII).

В цитоплазме клетки молекулы *т*РНК представлены двумя формами: это *т*РНК в свободной форме и *т*РНК, связанная с аминокислотой. Как правило, для каждой аминокислоты существует одна *т*РНК. Однако, есть аминокислоты, которые переносятся разными *т*РНК. Например, для бактерии кишечной палочки установлено, что аминокислота лейцин переносится пятью различными *т*РНК, аминокислота серин переносится тоже пятью разными *т*РНК.

Как обнаружили *т*РНК и доказали ее функцию? Особо тонко измельченные клетки печени — *гомогенаты* разделили на четыре части (фракции): ядерную, митохондриальную, микросомную, и растворимую (цитозоль). Оказалось, что микросомы содержат рибосомы, на которых осуществляется синтез белка. Но сами по себе одни рибосомы синтезировать белок не могут. Для его синтеза нужно обязательное присутствие дополнительных факторов, таких, как аминокислоты, АТФ, а также цитозоль — жидкая составляющая цитоплазмы вместе с растворенными в ней веществами. Что же находится в цитоплазме, что делает возможным синтез белка при наличии всех остальных компонентов?

При тщательном изучении оказалось, что в цитоплазме присутствует *т*РНК, которая осуществляет перенос аминокислот, транспорт их из жидкой среды на рибосомы, в место непосредственного синтеза белка.

РИБОСОМНАЯ РИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА И РИБОСОМЫ

Рибосомная РНК, так же как и *и*РНК, имеет большую молекулярную массу, но в отличие от последней характеризуется относительной метаболической стабильностью. После синтеза они существуют в клетке более продолжительное время, чем *и*РНК. Рибосомную РНК выделяют из смеси с *т*РНК, получившейся после соответствующей обработки гомогенатов тканей. Чистые препараты *р*РНК получают из очищенных рибосом или из составных частей рибосом — *субъединиц.*

Рибосомную РНК экстрагируют из рибосом с помощью фенола. Так, например, после экстракции *р*РНК из рибосом кишечной палочки *р*РНК получена в виде линейных одноцепочечных молекул трех видов. Рибосомная РНК содержит четыре главных азотистых основания: аденин, гуанин, цитозин и урацил. Следует отметить, что в *р*РНК, как и в *т*РНК, некоторые нуклеотиды метилированы, т. е. метилированы их основания. Существует несколько предположений о функциях, которые выполняет *р*РНК.

Структура специфических участков связывания в рибосомах, по-видимому, определяется свойствами *р*РНК. Высокоупорядоченное расположение их на рибосоме и само строение рибосомы также определяются, наверное, последовательностью нуклеотидов *р*РНК. Наиболее подробно исследовано строение рибосом бактерий. Если вызвать каким-либо способом неполное разрушение этих рибосом, то они распадаются на два фрагмента, каждый из которых состоит из РНК и белков, количество которых составляет 20—30 в каждом фрагменте.

Природа создала универсальную организацию рибосом. Какой бы живой организм ни взяли, в любых его клетках рибосомы построены по единому плану: они состоят из двух субъединиц — большой и малой. Большая субъединица рибосомы клеток содержит *р*РНК с молекулярной массой от $1{,}1 \cdot 10^6$ до $1{,}65 \cdot 10^6$, а малая субъединица — от $0{,}5 \cdot 10^6$ до $0{,}65 \cdot 10^6$.

Рибосомные белки нерастворимы в воде при pH7 в

обычных условиях. Нерастворимость рибосомных белков связана с тем, что они представляют собой компактные структуры, свернутые в клубок. 20 различных белков, которые входят в состав, например, одной из рибосомных субъединиц, можно разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле при pH 4,5. Можно экстрагировать субъединицы рибосом концентрированным раствором хлористого цезия (Cs Cl). При этом, например, из 30 S-субъединицы в мягких условиях извлекаются только поверхностные белки. Не извлекается более стабильная, устойчивая к экстракции сердцевина. Из сердцевины белки извлекаются только более жесткими методами. Сердцевина, оставшаяся после экстракции, выделяется в виде 23 S-фрагмента.

Рибосомы эукариот по своим размерам гораздо крупнее, чем рибосомы прокариот: диаметр их составляет 22 нм, молекулярная масса — около $4 \cdot 10^6$.

Как большая, так и малая субъединицы рибосом представляют собой комплекс *р*РНК и белка — рибонуклеопротеидный комплекс или так называемый рибонуклеопротеидный тяж. Концепцию рибонуклеопротеидного тяжа выдвинул в 60-е годы отечественный ученый А. С. Спирин. В рибосомной субъединице молекула *р*РНК служит каркасом для присоединения рибосомных белков. После этого рибонуклеопротеидный тяж сворачивается в более компактную систему, образуя третичную структуру — возникает собственно рибосомная субъединица.

Строение рибосомы определяет функциональное предназначение *р*РНК, которая выполняет структурную функцию в рибосомах. Точнее, функция *р*РНК сходна с функциями таких систем, как актомиозин мышц, микротрубочки жгутиков эукариот, т. е. с молекулярными системами, способными к сокращению и перемещению.

Кроме высокомолекулярной *р*РНК, в состав рибосом входят две низкомолекулярные *р*РНК, также выполняющие структурные функции. Одна из этих РНК, связанная с большой субъединицей рибосомы, содержит всего около 120 рибонуклеотидов. Такая РНК обнаружена во всех клетках и бактериях, кроме клеток растений. С большой рибосомной субъединицей связана еще одна низкомолекулярная РНК, которая обнаружена во всех растительных и животных клетках. Соединение этой РНК с *р*РНК большой рибосомной субъ-

единицы осуществляется с помощью водородных связей.

Структурная функция *р*РНК является основной, но не исчерпывающей. Установлено, что *р*РНК выступает в роли своеобразного якоря, за который цепляется *и*РНК. По крайней мере в молекуле *и*РНК и в молекуле *р*РНК имеются специфические комплементарные участки. За счет этих участков осуществляется первоначальное связывание *и*РНК и рибосомы.

Еще одной функцией *р*РНК является формирование активного центра рибосомы. В активном центре происходит образование пептидных связей между молекулами аминокислот в процессе синтеза белка.

Синтезируется *р*РНК в ядре клеток, а точнее, в ядрышке. Синтез *р*РНК осуществляется с помощью специфического фермента, который называется РНК — полимеразой. Синтез *р*РНК осуществляется на определенных участках нити ДНК, каждый из которых кодирует соответствующую *р*РНК. В ДНК клетки содержится большое число копий генов, кодирующих молекулы *р*РНК. Рибосомные гены в зависимости от вида организма могут быть сгруппированы в одной хромосоме или расположены в нескольких хромосомах.

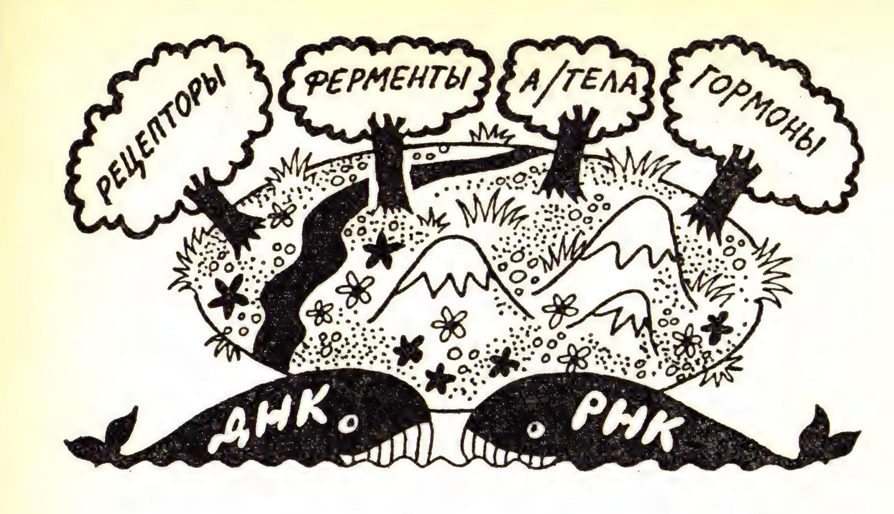
Сказанное выше позволяет сделать вывод, что все типы РНК представляют собой функционально объединенную систему, направленную на осуществление синтеза молекул белка.

Глава 5

РОЛЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОСИНТЕЗЕ БЕЛКА

Белки являются необходимым компонентом любого живого организма. В организме они выполняют ряд функций, обеспечивающих его жизнедеятельность. Из белка в комплексе с другими органическими веществами построены все клетки и многие внеклеточные образования — это пластическая функция. Белки обладают также каталитической способностью. Такие белки называются ферментами. Без ферментативного катализа не протекает почти ни одна биохимическая реакция. Существуют белки, выполняющие специфические функции. К таким белкам относятся актин и миозин, которые обеспечивают сокращение многих органов и тканей. Велика транспортная функция белков. Перенос веществ в крови осуществляется отдельными белковыми молекулами, например альбумином и липопротеидными комплексами. Регуляторная функция осуществляется белками-гормонами. Большое значение для организма имеет также защитная функция белков, ответственных за иммунитет. *Иммунитет* — невосприимчивость организма по отношению к возбудителям болезней или определенным ядам. К белкам, обеспечивающим иммунитет, относятся, например, иммуноглобулины (антитела), лизоцим, комплемент. И наконец, представляет огромный интерес рецепторная функция белков, находящихся на поверхности клеток и взаимодействующих с гормонами и антигенами. К антигенам относятся различные яды, бактерии, вирусы, чужеродные клетки.

Исходя из перечисленных функций белков становится понятной та роль, которую они играют в жизне-



деятельности клетки и организма в целом. Но как же образуются белки? Что позволяет постоянно пополнять уровень белков в организме без ухудшения их свойств?

Оказывается, что в организме существует единая белоксинтезирующая система. В нее входит система нуклеиновых кислот, которая представлена совокупностью ДНК и РНК. Общая схема синтеза белка с участием всех типов нуклеиновых кислот представлена на рис. XX.

ТРАНСКРИПЦИЯ — ПЕРВЫЙ ЭТАП РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Генетическая информация вначале переносится с ДНК на *и*РНК. Этот процесс называется транскрипцией. Для того чтобы произошла транскрипция, необходимо предварительно иметь доступную для считывания информации ДНК. Поэтому вначале происходит раскручивание спирали ДНК.

Раскручивание суперспирали для считывания генетической информации происходит не по всей длине хромосомы, а в строго определенном месте — там, где происходит синтез информационной РНК (рис. 5). Образуются так называемые пуффы, которые видны в световой микроскоп на отдельных участках хромосомы. Нить ДНК превращается в пуфф, внешне похожий на голов-

ку одуванчика. В этих пуффах двойная спираль ДНК доступна для считывания молекулами РНК генетической информации. С генов ДНК осуществляется транскрипция. Пуффы образуются в результате набухания и разрыхления хромомер хромосом. Пуфф возникает путем деконденсации хроматиновых нитей, уложенных в хромомере. Гигантские пуфы называются кольцами Бальбиани. Процесс образования пуффов является обратимым. Появление пуффов рассматривается в качестве морфологического выражения активности генов данной хромосомы.

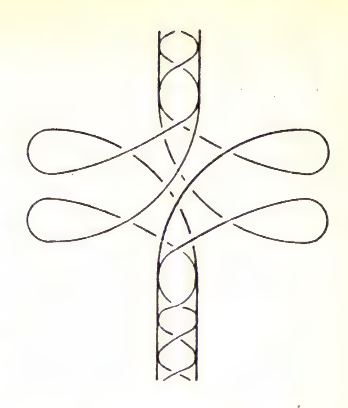


Рис. 5. Схема пуффа — участка раскручивания суперспирали ДНК. В таком виде нити ДНК становятся более доступными для считывания генетической информации.

К участкам раскрученной ДНК подходят рибонуклеотиды, из которых строится молекула *и*РНК, которая передает содержание гена в цитоплазму клетки для синтеза соответствующих белков. Исчезновение пуффа указывает на скручивание ДНК. С этого участка ДНК считывание генетической информации становится невозможным. Таким образом, возникновение пуффов, т. е. раскручивание спирали ДНК, и исчезновение их в результате скручивания спирали ДНК возможно и является механизмом регуляции передачи генетической информации из ядра в цитоплазму.

Транскрипция структурных генов оперона, кодирующих специфические ферменты конкретного метаболического пути, осуществляется *и*РНК при соответствующем «разрешении» этого процесса регуляторными генами. Например, структурные гены какого-либо оперона, входящего в состав нити ДНК, кодируют синтез нескольких ферментных белков, осуществляющих метаболическое превращение продукта, поступающего в клетку извне. Пока этот продукт отсутствует, с геном-оператором связан репрессорный белок, подавляющий транскрипцию *и*РНК. Репрессорный белок постоянно присутствует в окружении гена-оператора, так как его синтез контролирует постоянно функционирующий ген-регулятор. Как только продукт появляется в клетке, он

взаимодействует с репрессорным белком. Последний теряет способность связываться с геном-оператором. В этих условиях *и*РНК считывается со структурных генов и затем переносится в белоксинтезирующую систему с образованием специфического ферментного белка. Появившиеся в большом количестве молекулы фермента осуществляют превращения данного вещества. При исчезновении в окружающем клетку пространстве данного химического вещества репрессорный белок снова связывается с геном-оператором и транскрипция *и*РНК прекращается.

Ученые обратили внимание на то, что существуют различия в процессах синтеза белка у прокариот и эукариот. Транскрипция и трансляция у эукариот разделены во времени и пространстве. У бактерий отсутствие оформленного ядра делает возможной трансляцию *и*РНК на рибосомах уже тогда, когда ее растущий конец еще списывается с ДНК. Этот процесс был хорошо изучен на примере триптофанового оперона кишечной палочки.

Было замечено, что при высокой концентрации триптофана синтезируется *и*РНК, состоящая из 130 нуклеотидов, а при низкой — из 700 нуклеотидов. Предположим, что транскрипция триптофан-оперона должна регулироваться другим участком ДНК также регулирующим синтез *и*РНК. Такой участок называется *аттенюатором.*

Проследим по схеме (рис. XXIII), как происходит этот процесс. Когда триптофан имеется в избытке (А), участок (1) *и*РНК полностью транслируется. Участок (2) взаимодействует с рибосомой, что позволяет основаниям участков 3 и 4 спариваться. Эта спаренная область сигнализирует РНК-полимеразе о том, что следует закончить транскрипцию. Если же триптофана не хватает (Б), участки 3 и 4 не взаимодействуют, так как рибосома застревает на кодонах участка 1. Участок 2 взаимодействует с участком 3 вместо того, чтобы входить в рибосому. Участки 3 и 4 не спариваются, траскрипция продолжается.

На самом деле процесс транскрипции гораздо сложнее. Он включает в себя этап так называемого созревания *и*РНК. Новосинтезированные РНК, выделенные из ядра, значительно длиннее молекулы *и*РНК, которая из них получается. В частности, первичная РНК, кодируемая геном ß-глобина, содержит две нетранслируемые

области. Эти вставочные последовательности в первичной РНК вырезаются, а кодирующие последовательности одновременно соединяются под действием фермента сплайсинга. Так образуется зрелая *и*РНК (рис. 6). Кодирующие последовательности прерывистых генов называются *экзонами*, а вставочные последовательности — *интронами*.

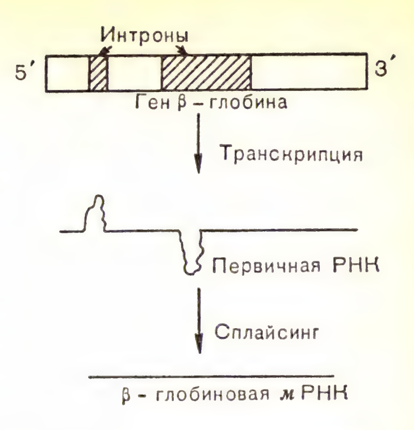


Рис. 6. Транскрипция гена — β-глобина и удаление вставочных последовательностей из первичной РНК.

На рис. XXVII изображена схема взаимоотношений между кодогеном ДНК, кодоном *и*РНК и антикодоном *т*РНК. Зеленым цветом обозначен аденин, серым — гуанин, красным — тимин, белым — цитозин, желтым — урацил. Вначале происходит копирование генетической информации с кодогена ДНК на кодон *и*РНК. В последующем при построении белковой цепи происходит соединение антикодона *т*РНК с кодоном *и*РНК.

Возникает вопрос: каким образом считывание генетической информации, заключенной в нуклеотидной последовательности *и*РНК, приводит к тому, что аминокислоты собираются в полипептидную цепь, в которой аминокислотные остатки расположены в специфической последовательности?

Полипептидная цепь строится с помощью ферментного механизма. Правильный перенос информации от *и*РНК к полипептиду обеспечивается за счет функционирования рибосом.

РИБОСОМЫ — МЕСТО СИНТЕЗА БЕЛКА

Местом синтеза белка являются рибосомы, состоящие из *р*РНК и белка. Рибосомы на 50—60 % содержат *р*РНК и на 35—50 % — белок. Рибосомы занимают значительную часть клетки. Так, в клетках бактерий кишечной палочки масса рибосом составляет около 25 % от общей массы бактериальной клетки. В такой клетке находится примерно 15 000 рибосом. Масса одной рибо-

сомы равняется 2,8 · 10^6, а диаметр ее составляет 18 нм (рис. XXIX).

Рибосомы — это центры синтеза белка. Рибосомы располагаются на мембранах эндоплазматической сети (ЭПС), которая пронизывает цитоплазму всей клетки. В пространство эндоплазматической сети поступают синтезированные в рибосомах белки и направляются в те места где они необходимы. Программа синтеза каждого белка заключена в *и*РНК.

В процессе синтеза белка рибосома защищает *и*РНК и синтезируемый белок от разрушающего действия клеточных ферментов типа РНК-аз и протеаз. Механизм защитного действия заключается в том, что нить *и*РНК проходит между большой и малой субъединицами рибосомы, а начальная часть вновь синтезируемого белка находится в каналоподобной структуре большой субъединицы (рис. 7).

Если сравнить массу молекулы *и*РНК и общую массу молекул белка, который синтезируется на этой *и*РНК, то окажется, что масса белка намного превосходит количество имеющейся *и*РНК. Каким же образом синтезируется этот избыточный белок? Оказывается, что с одной молекулой *и*РНК соединяется несколько рибосом, на которых и происходит синтез белка. Так, примерно на каждые 150 триплетов *и*РНК приходится 5—7 рибосом. Такой комплекс из нескольких рибосом называется, как отмечалось ранее, полисомой (рис. XXVIII).

Как же удерживаются вместе рибосомы в полисоме? Оказывается, полисомы можно разделить на отдельные рибосомы, подвергнув их действию специфических ферментов-рибонуклеаз, разрушающих связи между молекулами РНК. Этот факт означает, что рибосомы в полисоме удерживаются нитью РНК, а именно *и*РНК. Действительно, при изучении полисом в электронный микроскоп видна нить *и*РНК, соединяющая воедино отдельные рибосомы.

При дальнейшем изучении полисом оказалось, что число рибосом в полисоме прямо пропорционально числу аминокислотных остатков в синтезируемом полипептиде. Был сделан вывод, что *и*РНК одновременно считывается несколькими рибосомами, которые расположены на некотором расстоянии друг от друга вдоль цепи *и*РНК. Но это не означает, что каждая из рибосом зависит от присутствия соседей. Отдельные рибосо-

мы в полисоме могут независимо синтезировать полную полипептидную цепь. Зачем же нужна тогда полисома? Оказывается, образование полисом повышает эффективность функционирования *и*РНК за счет того, что протекает одновременный синтез нескольких полипептидных цепей.

А какова длина молекулы *и*РНК? Рассмотрим синтез такого распространенного белка, как, например, гемоглобин. Полипептидная цепь субъединицы гемоглобина состоит из 150 аминокислот. Она кодируется молекулой *и*РНК, состоящей из $3 \cdot 150 = 450$ нуклеотидов, что соответствует длине цепи около 150 нм. Но диаметр рибосом составляет всего 15—22 нм. Таким образом, становится очевидным, что на одной *и*РНК вполне могут разместиться несколько рибосом. Полисомы содержат от 5—6 до нескольких десятков рибосом. Если принять число рибосом равным шести, то получается, что расстояние между ними составляет примерно 3 нм при учете того, что диаметр рибосом 22 нм. Из этого также следует, что рибосомы вполне могут работать и в условиях ограниченного пространства.

Сейчас высказывается предположение, что работа нескольких рибосом, входящих в состав полисомы, синхронизирована во времени.

Реально существуют полисомы, в состав которых входит от 60 до 100 рибосом. К таким крупным полисомам относятся полисомные системы, ответственные за синтез полипептидных цепей миозина.

Процесс считывания генетической информации, заключенной в характерной последовательности нуклеотидов *и*РНК приводит к тому, что аминокислоты соединяются в строго специфическую последовательность белковой цепи. Это является третьим этапом сохранения генетической непрерывности существования живых организмов. Напомним, что первый этап — это передача потомству генетической информации посредством репликации ДНК, а второй этап — перевод информации, заложенной в ДНК, в генетическую информацию, кодируемую в *и*РНК.

Исходя из того, что местом синтеза полипептидной цепи являются рибосомы, вопрос о биосинтезе белка в принципе сводится к вопросу функционирования рибосом. Нормальное функционирование рибосом обеспечивает правильное функционирование процесса перевода информации, заключенной в *и*РНК, в последователь-

ность аминокислот в полипептидной цепи. Это и определяет первичную структуру белка и в конечном счете функцию белка, которую он выполняет в клетке и в организме в целом.

Как же было доказано, что именно на рибосомах происходит синтез белка? Чтобы доказать это положение, экспериментальным животным вводили меченые радиоактивными веществами аминокислоты. Спустя некоторое время печень животных удаляли, гомогенизировали и получившуюся массу делили на фракции. Для разделения на фракции использовали метод центрифугирования. Получались отдельные фракции клеточных органелл, которые анализировали на наличие в них меченых аминокислот. Если для исследования печень удаляли через несколько дней после введения животным аминокислот, то радиоактивный белок находили во всех субклеточных фракциях. Если же печень брали через несколько минут после инъекции меченых аминокислот, то радиоактивный белок обнаруживали только во фракции микросом, т. е. частиц, представляющих собой «осколки» мембран эндоплазматической сети вместе с рибосомами. Этот факт указывал на то, что вначале синтез белка происходит на рибосомах. Затем синтезированный белок транспортируется и к другим клеточным структурам.

Позднее стали получать прямые доказательства того, что синтез белка осуществляется на рибосомах. Для этого брали свежеприготовленные гомогенаты печени экспериментальных животных, добавляли АТФ и получившуюся систему хранили, или, иначе говоря, инкубировали, с аминокислотами, меченными радиоактивными веществами. После нескольких минут инкубации систему разделяли на фракции. Оказалось, что меченые аминокислоты выявлялись в микросомах.

Понимание механизма синтеза белка позволило смоделировать этот процесс вне клетки. Такая модельная система состоит из ДНК, рибосом, *и*РНК, аминокислот, АТФ и фермента, регенерирующего АДФ в АТФ. Для точного исследования белоксинтезирующей функции рибосом к рибосомным системам добавляют все основные 20 аминокислот, а метят радиоактивной меткой только одну из них. Все вещества сливают вместе и инкубируют при температуре человеческого тела (37 °С) в течение 10—60 минут. После окончания эксперимента регистрируют радиоактивность полученного белка. Интенсив-

ность белкового синтеза оценивают по количеству меченых аминокислот, вошедших в состав белковой молекулы. Радиологический анализ осуществляют после выделения белка из инкубационной смеси в кислой среде, поскольку в кислой среде белок не растворяется.

Для осуществления синтеза к указанной смеси необходимо добавить фермент аминоацил-*т*РНК-синтетазу, который находится в цитозоле. Использование бесклеточной системы синтеза белка позволило понять механизм соединения аминокислот в полипептидную цепь.

Важной особенностью функционирования этой системы является то, что синтез белка можно остановить добавлением дезоксирибонуклеазы. Этот фермент разрушает молекулу ДНК, являющуюся матрицей для синтеза новых *и*РНК (рис. XXXI). Поскольку *и*РНК, имеющаяся в смеси ко времени добавления дезоксирибонуклеазы, неустойчива и быстро разрушается, синтез белка прекращается в течение нескольких минут. Однако синтез белка можно возобновить при добавлении извне новой порции *и*РНК.

Мы убедились, что белковый синтез может идти и вне клетки, т. е. для протекания белкового синтеза совсем не важно сохранение клеточной мембраны в ненарушенном состоянии в составе клетки.

Скорость синтеза белка в реконструированных системах, т. е. в системах, собранных из отдельных частей (рибосом, АТФ, цитозоля или аминокислот), значительно ниже, чем в самих клетках. Это является следствием, по-видимому, того, что упорядоченная структура, в составе которой находятся рибосомы в клетке, играет роль в осуществлении синтеза белковых молекул.

При более подробном исследовании гомогенат печени стали разделять на четыре фракции: ядерную, митохондриальную, микросомную и растворимую (цитозоль). Добавляя к этим фракциям АТФ и меченые аминокислоты, исследовали способность фракций синтезировать белок. Оказалось, что для синтеза белка необходимо присутствие либо микросомной, либо растворимой фракции. Добавление митохондрий требовалось только для того, чтобы они генерировали АТФ.

Для изучения компонентов, ответственных за синтез белка, проводили разделение на фракции микросом, меченных аминокислотами. Оказалось, что радиоактивность обнаруживается только во фракции, содержащей

мелкие рибонуклеопротеидные частицы. Такие частицы находятся в цитоплазме клеток на поверхности мембран эндоплазматической сети. ЭПС служит поддерживающей структурой, на которой располагаются рибосомы. Они осаждаются вместе с фрагментами эндоплазматической сети, поскольку связаны с ним. Отделить рибосомы от мембраны ЭПС можно только обработкой их нейтральными растворами солей желчных кислот. Затем рибосомы отделяют от фрагментов эндоплазматического ретикулума путем центрифугирования. Получается своеобразная очистка рибосом от мембранных структур клетки.

При инкубации очищенных рибосом с АТФ и ионами магния в присутствии цитозоля оказалось, что они активно включают аминокислоты в синтезируемые белки. Это еще раз подтвердило, что именно рибосомы регулируют синтез белка в клетках.

После того как была доказана функция рибосом в клетках печени, в многочисленных исследованиях на других клеточных моделях были получены доказательства того, что включение меченых аминокислот происходит именно в рибосомной фракции.

ЭТАПЫ ВКЛЮЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ПОЛИПЕПТИД

Биосинтез белковой цепи на рибосоме осуществляется следующим образом. К триплету *и*РНК, кодирующему какую-либо аминокислоту, приближается *т*РНК, антикодон которой комплементарен, т. е. соответствует кодону *и*РНК (рис. XXVII). Эта *т*РНК несет аминокислоту, которая соответствует кодону *и*РНК и, следовательно, той программе, которая заложена в ДНК. Аминокислота с *т*РНК на время перемещения в цитоплазме клетки образуют комплекс, называемый аминоацил-*т*РНК. Аминоацил-*т*РНК присоединяется к аминоацильному участку рибосомы. Здесь происходит образование пептидной связи между принесенной аминокислотой, входящей в состав комплекса аминоацил-*т*РНК, и свободным концом вновь синтезируемой цепи белка.

После образования пептидной связи *т*РНК перемещается в пептидильный участок рибосомы (рис. 7). Одновременно с этим рибосома целиком передвигается в направлении следующего кодона *и*РНК, который кодирует местоположение следующей аминокислоты в

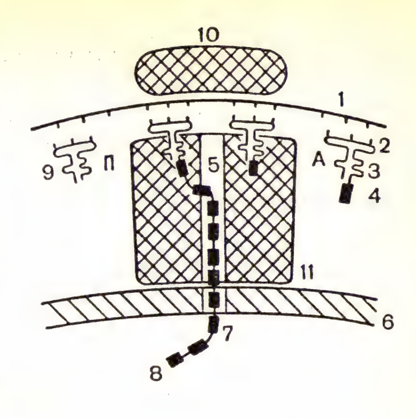


Рис. 7. Строение рибосомы и схема протекающего в ней синтеза белка. Обозначения: А — аминокислотный участок рибосомы, П — пептильный участок, *1* — кодон *и*РНК, *2* — антикодон *т*РНК, *3* — *т*РНК, входящая в рибосому, *4* — аминокислота, *5* — каналоподобная структура, *6* — мембрана эндоплазматического ретикулума, *7* — пора в мембране эндоплазматического ретикулума, *8* — вновь синтезируемый белок, *9* — *т*РНК, вышедшая из рибосомы, *10* — малая субъединица, *11* — большая субъединица.

цепи белка. Молекула *т*РНК, которая принесла аминокислоту, включенную в цепь белка, и находится теперь в пептидильном участке рибосомы, отщепляется от этого участка и уходит в цитоплазму, где присоединяет новую аминокислоту. К аминоацильному участку одновременно присоединяется следующий комплекс аминоацил-*т*РНК, присоединение которого обусловлено соответствующим кодоном *и*РНК. Соединение аминокислот в белковую цепь осуществляется в месте выхода каналоподобной структуры в зазор между большой и малой субъединицами рибосомы так, что синтезируемый белок располагается в этой каналоподобной структуре и по завершении синтеза через пору в мембране эндоплазматической сети поступает в ее внутреннее пространство эндоплазматического ретикулума для окончательного формирования и транспорта по месту назначения. Большинство *экзогенных белков,* т. е. белков, выходящих из клетки наружу, после биосинтеза скапливается в эндоплазматической сети, а при необходимости выходит из клетки наружу.

Первым этапом биосинтеза белка в клетке является активация аминокислоты. Активацию аминокислот осуществляют ферменты аминоацил-*т*РНК-синтетазы. Эти ферменты специфичны по отношению к аминокислотам, т. е. для каждой аминокислоты существует своя аминоацил-*т*РНК-синтетаза (рис. 8). Механизм активации заключается в том, что фермент одновременно взаимодействует с соответствующей аминокислотой и с АТФ, которая теряет при этом пирофосфат. Ниже на схеме

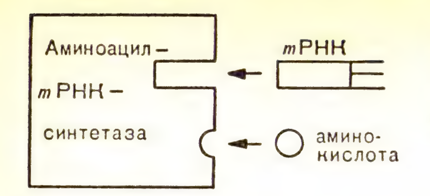


Рис. 8. Схема взаимодействия аминоацил-*т*РНК-синтетазы с *т*РНК и аминокислотой. Аминоацил-*т*РНК-синтетаза имеет двойную специфичность по отношению к *т*РНК и аминокислоте.

можно увидеть процесс активации аминокислоты с образованием активированного комплекса, где аденозинмонофосфат сокращенно обозначается АМФ:

$$\text{аминоацил тРНК синтетаза} + \text{АТФ} + \underset{\text{аминокислота}}{NH_2-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COOH} \rightleftharpoons$$

$$\underset{\text{тройной комплекс}}{\text{аминоацил–тРНК–синтетаза}\begin{cases}\text{АМФ} \\ NH_2-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COOH\end{cases}} + \underset{\text{пирофосфат}}{O=\overset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{\displaystyle O^-}{\underset{|}{P}}}}-O-\overset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{\displaystyle O^-}{\underset{|}{P}}}}=O}$$

Тройной комплекс из фермента, аминокислоты и АМФ называется активированной аминокислотой. Активированная аминокислота является исходным блоком для построения молекулы полипептида.

Вторым этапом синтеза белка является присоединение к аминокислоте молекулы *т*РНК, осуществляющей доставку этой аминокислоты в рибосомную систему синтеза белка. Присоединение активированной аминокислоты к *т*РНК происходит за счет эфирной связи между карбоксильной группой аминокислоты и гидроксильной группой рибозы. Схема образования связи между аминокислотой и *т*РНК представляется следующим образом:

$$\text{аминоацил–тРНК–синтетаза}\begin{cases}\text{АТФ} \\ NH_2-\underset{\displaystyle P}{\underset{|}{CH}}-COOH\end{cases} + \text{тРНК} \rightleftharpoons$$

$$NH_2-\underset{\displaystyle P}{\underset{|}{CH}}-CO-\text{тРНК} + \underset{\text{аденозинмонофосфат}}{\text{АМФ}} + \text{аминоацил тРНК синтетаза}$$

Строгая специфичность в отношении выбора аминокислоты соответствующей молекулой *т*РНК осуществляется за счет специфичности взаимодействия амино-

ацил-*т*РНК-синтетазы с аминокислотой, с одной стороны, и *т*РНК — с другой (рис. 18). Это явление называется двойной специфичностью, т. е. фермент одновременно специфичен и в отношении *т*РНК, и в отношении аминокислоты.

Молекулы *т*РНК, присоединяющие к себе различные аминокислоты, имеют различные последовательности оснований, благодаря чему синтетазы легко узнают их. Более сложная задача для синтетаз — это различить сходные аминокислоты. Например, единственным различием между изолейцином и валином является то, что изолейцин содержит дополнительную метиленовую группу (рис. XIX). Дополнительная энергия связи, которую вносит эта группа ($—CH_2—$), благоприятствует тому, что активация изолейцина происходит примерно в 200 раз чаще, чем активация валина. Концентрация валина в некоторых организмах примерно в 5 раз выше концентрации изолейцина, так что валин должен был бы неправильно включаться вместо изолейцина в одном случае из 40. Однако наблюдаемая частота ошибок составляет всего 1:3000. Это означает, что должна существовать еще одна стадия коррекции ошибок. Действительно, сама синтетаза исправляет свои собственные ошибки. Валин, активированный по ошибке, не переносится на *т*РНК, специфичную к изолейцину. Вместо этого *т*РНК способствует гидролизу связи валин-АМФ и таким образом предупреждает его неправильное включение в белок. Кроме того, эта гидролитическая реакция освобождает синтетазу для активации и переноса изолейцина — правильной аминокислоты.

На рис. X изображены последовательные этапы сборки пептидов из аминокислот. Сборка протекает на рибосомах при помощи *и*РНК и *т*РНК. Большими шарами на рисунке обозначены аминокислоты. На *р*РНК существуют специфические триплеты, к которым присоединяется *и*РНК. Специфические триплеты занимают два соседних кодона *и*РНК. К этим кодонам подстраиваются своими антикодонами две молекулы *т*РНК со своими аминокислотами.

Непосредственно синтез белка в рибосомной системе начинается со взаимодействия малой субъединицы рибосомы с комплексом аминоацил-*т*РНК. Затем к комплексу малой субъединицы с аминоацил-*т*РНК присоединяется *и*РНК. Далее к образовавшемуся комплексу

присоединяется большая субъединица рибосомы, после чего весь рибосомный комплекс начинает перемещаться в направлении 3′-конца молекулы *и*РНК. При этом аминоацильный участок рибосомы находится впереди, а пептидильный участок — сзади. В процессе движения комплексы аминоацил-*т*РНК, соответствующие последовательности кодонов молекулы *и*РНК, поступают в аминоацильный участок рибосомы, а после отщепления от этого комплекса аминокислоты молекула *т*РНК поступает в пептидильный участок рибосомы. Происходит объединение двух молекул аминокислот. После этого одна из молекул *т*РНК отходит от *и*РНК, а ко второй молекуле *т*РНК присоединяется следующая *т*РНК с аминокислотой. Затем третья и так далее, пока не будет выстроена полипептидная цепь, длина которой зависит от структуры ДНК, определяемой количеством триплетов, кодирующих аминокислоты данного белка.

Таким образом, последовательность кодонов *и*РНК определяет последовательность включения аминокислот в цепь белка. Другие виды РНК выполняют при этом как бы вспомогательную роль: *т*РНК доставляет аминокислоты, необходимые для осуществления биосинтеза белка, а *р*РНК создает центры (рибосомы), на которых осуществляется этот биосинтез.

Важным моментом в процессе биосинтеза белка является идентификация — установление совпадения триплета *и*РНК (кодона) с триплетом *т*РНК (антикодоном). Идентификация происходит вследствие комплементарности трех азотистых оснований *и*РНК трем азотистым основаниям *т*РНК, расположенным на выступающей части петли нити *т*РНК. Идентификация триплетов *и*РНК является необходимым условием биосинтеза полипептидной цепи.

Процесс синтеза белка представляет собой, по сути дела, ферментативный процесс, представленный серией ферментативных реакций. Интересно, что в этом механизме принимает непосредственное участие тот же самый свободный нуклеотид — АТФ. Аденозинтрифосфат является источником энергии, необходимым для образования пептидной связи. Ферментативный механизм построения полипептидной цепи обеспечивает специфичность взаимодействия всех звеньев пути синтеза белка.

Существуют два предположения о кодировании

аминокислот на нити *и*РНК: предположения о неперекрывающемся и перекрывающемся кодах, которые изображены на схеме:

```
                                        Аспн      Про
                                      ┌────┴───┬───┴────┐
—А—А—Т—Г—Т—Ц—                        —А—А—Т—Г—Т—Ц—
 └──┬──┘ └──┬──┘                      └──┬──┘ └──┬──┘
   Вал      Про                          Вал      Глу
```

неперекрывающийся код — перекрывающийся код

Исходя из наблюдений и экспериментальной проверки установлено, что в природе используется неперекрывающийся код. Если бы существовал перекрывающийся код, то имелась бы большая вероятность, что между соседними аминокислотами обнаруживается связь, как результата общности двух нуклеотидов. Тогда при статистическом исследовании между соседними аминокислотами должна была бы существовать связь. Например, если какая-то аминокислота определяется триплетом из аденинов, то каждая из соседних с ней аминокислот должна обязательно определяться двумя аденинами и каким-либо третьим нуклеотидом. В таком случае, если исходным триплетом будет ААА, то соседние триплеты — ААТ, ААГ или ААЦ. Корреляцию между соседними нуклеотидами в их последовательности в молекуле РНК можно определить двумя методами.

Пользуясь одним из этих методов, определяют все способы соотношения 20 аминокислот с 20 триплетами путем проб и ошибок. В ходе экспериментальной проверки этого метода для анализа цепи аминокислот инсулина установлено, что при любом возможном соотношении аминокислот, расположенных в отдельных участках молекулы инсулина, с кодирующими их триплетами нельзя было объяснить существующую последовательность аминокислот перекрывающейся моделью.

Другой метод предполагает изучение вероятности распределения комбинаций аминокислот в последовательности ряда белков, доказывает существование неперекрывающегося кода. Этот подход основан на изучении статистики распределения пар соседних аминокислот в белковых цепях. В результате проведенного таким методом исследования многих белков установлено, что полученные распределения являются чисто случайными.

Было окончательно доказано. что перекрывающегося кода не существует.

Следует отметить, что это верно лишь в том смысле, что для кодирования каждой аминокислоты необходим в принципе новый триплет. Реально же в природе существуют последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие синтез трех разных белков со сдвигом на один нуклеотид. Естественно, что такой синтез осуществляется не одновременно. Такой экономный способ кодирования обнаружен у вирусов.

В 1970 г. Д. Сабатини и Г. Блобел предположили, что сигналом прикрепления синтезируемого белка к мембране эндоплазматической сети служит последовательность аминокислотных остатков, прилегающая к N-концу новообразующейся полипептидной цепи, которая называется сигнальной последовательностью (рис. XXIV).

Предположение о сигнальной последовательности было подтверждено С. Милстайном и Д. Браунли, которые показали, что иммуноглобулиновая цепь, синтезированная «in vitro» свободными рибосомами, содержит N-концевую последовательность из 20 остатков, которых нет в зрелом белке, синтезированном в живом организме. Затем было обнаружено, что все основные секреторные белки поджелудочной железы, синтезированные в пробирке на свободных рибосомах, содержат на N-конце дополнительные фрагменты длиной около 20 аминокислот. Сигнальные последовательности многих секреторных белков имеют длину от 15 до 30 остатков. Сигнальные последовательности позволяют секреторным белкам проходить через мембрану эндоплазматической сети. При этом следует отметить, что синтезирующийся белок определяет, плавает ли связанная с ним рибосома свободно в цитозоле или связывается с мембраной эндоплазматической сети.

Возникновение специфической конформации белка на основе первичной структуры полипептидной цепи, необходимой для выполнения белком его функции, осуществляется без участия нуклеиновых кислот.

Синтезированный на рибосомах белок поступает в ЭПС. Белки, находящиеся во внутреннем пространстве эндоплазматической сети и в ее мембране, переносятся в аппарат Гольджи — колонку уплощенных мембранных мешочков (рис. XXVI). На примере гликопротеинов показано, что такие белки доставляются из ЭПС в

аппарат Гольджи в пузырьках диаметром 50 нм, окруженных оболочкой, представляющей собой многогранную решетчатую структуру (рис. XXV). Внутренняя поверхность мембраны окаймленного пузырька и аппарата Гольджи соответствует внутренней стороне мембран эндоплазматической сети. Когда окаймленные пузырьки сливаются с плазматической мембраной, их внутренняя поверхность становится наружней поверхностью плазматической мембраны. Следовательно, внутренняя поверхность мембраны ЭПС и других органелл соответствует наружней поверхности плазматической мембраны (рис. XXXII). По этой причине углеводные группы гликопротеинов плазматических мембран всегда расположены на ее наружной поверхности.

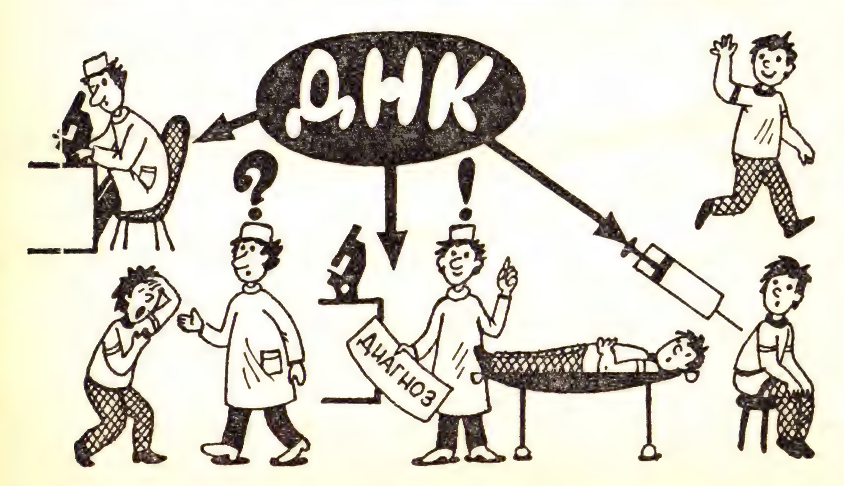
Таким образом, роль нуклеиновых кислот в биосинтезе белка заключается в преобразовании генетической информации, заложенной в последовательности нуклеотидов ДНК, в структуру молекулы *и*РНК, затем синтезирование полипептидной цепи из уже готовых строительных блоков — аминокислот.

Глава 6

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗНАНИЙ О НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ В МЕДИЦИНЕ

В медицине знания о нуклеиновых кислотах практически используются в трех направлениях. Во-первых, они помогают понять особенности возникновения и протекания заболеваний и патологических состояний, выяснить механизм жизнедеятельности организмов в норме. Во-вторых, с помощью изучения качественных и количественных изменений нуклеиновых кислот можно проводить диагностику некоторых заболеваний. В-третьих, в последнее время на основе знаний о нуклеиновых кислотах разработаны новые способы лечения отдельных заболеваний.

Развитие простых методов определения нуклеиновых кислот в биологических объектах дало возможность понять в ряде случаев причины возникновения болез-



ней, их протекание, а также многие вопросы регуляции физиологических процессов. Особенно большую службу сослужили методы исследования нуклеиновых кислот в отношении наследственных болезней.

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

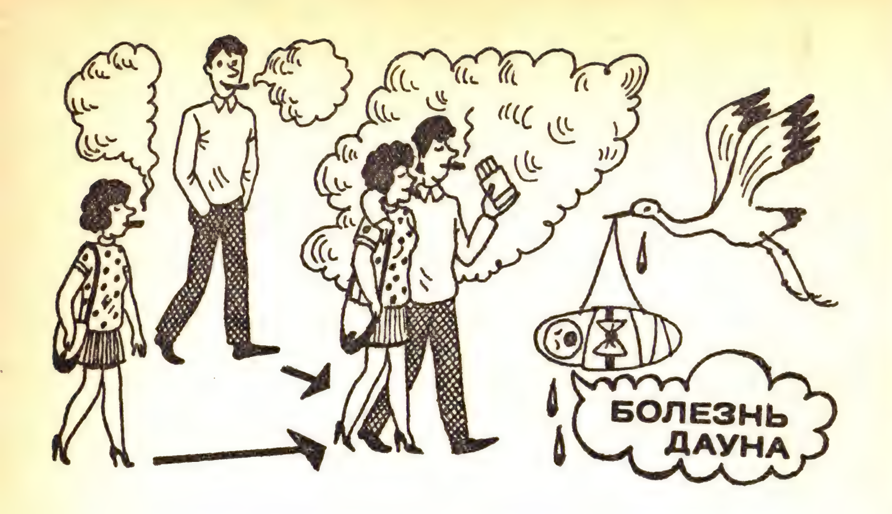
Знания о нуклеиновых кислотах дали возможность по-новому взглянуть на механизм наследственных болезней, которые были бы непонятны без теоретических исследований о передаче, хранении и реализации наследственной информации.

Наследственные болезни — это заболевания, обусловленные хромосомными и генными мутациями. С нарушением передачи и воспроизведения наследственной информации связаны также наследственные аномалии, к которым относится, например, альбинизм.

Наиболее типичными наследственными заболеваниями являются хромосомные болезни. *Хромосомные болезни* — это форма патологии, обусловленная нарушением структуры хромосом в соматических клетках. Хромосомные болезни связаны либо с утратой, либо с избытком хромосомного материала. Хромосомные нарушения хорошо видны в световой микроскоп. Большинство хромосомных болезней возникает вследствие геномных или хромосомных мутаций в половых клетках родителей или в первых делениях оплодотворенной клетки. Такие заболевания не наследуются из поколения в поколение, так как появление хромосомных нарушений связано с высокой смертностью зародышей еще в утробе матери.

К наиболее часто встречающимся хромосомным заболеваниям относятся болезнь Дауна, синдром Шерешевского-Тернера и синдром Клайнфельтера.

Болезнь Дауна описана еще в прошлом веке английским врачом Л. Дауном. Это форма врожденного слабоумия, сопровождающаяся физическим недоразвитием. *Ж. Лежен* в **1959** г. установил, что у людей с болезнью Дауна имеются три хромосомы № 21. Это явление было названо трисомией (по числу соматических хромосом). Статистика показывает, что трисомия возникает с относительно постоянной частотой — один случай на 700 новорожденных. Такие случаи возникают спонтанно и непрерывно. В последующем изучении причин заболеваний было показано, что повышать частоту



врожденных патологий, в том числе и болезни Дауна, могут определенные внешние факторы. Это относится к мутагенам, которые могут проникать в организм с пищей или при вдыхании.

Наиболее широко распространенными мутагенами являются химические соединения, которые входят в состав табачного дыма. Поэтому у курильщиков чаще рождаются дети с болезнью Дауна. Причем это увеличение частоты наблюдается независимо от того, курит мать или курит только отец ребенка.

С обнаружением в 1959 г. отклонений от нормального числа хромосом у больных наследственными болезнями появился новый раздел медицины — учение о хромосомных болезнях.

Некоторое значение для развития патологических состояний имеет распределение нуклеиновых кислот и белков в нуклеопротеидном комплексе. Например, при болезни Дауна дезоксирибонуклеопротеиды в отдельных участках ядер клеток более конденсированы (уплотнены, накоплены) по сравнению с дезоксирибонуклеопротеидами ядер клеток здоровых людей. Нельзя исключить, что некоторые проявления этого заболевания связаны с тем, что конденсация приводит к нарушению считывания генетической информации с ДНК.

В 1925 г. отечественный клиницист *Н. А. Шерешевский* впервые описал хромосомную болезнь, сейчас известную как синдром Шерешевского — Тернера.

Н. Тернер независимо представил описание этого синдрома в **1938 г.**

В 1942 г. американским врачом *Г. Клайнфельтером* впервые описана хромосомная болезнь, теперь известная как синдром Клайнфельтера.

В 1934 году *И. Феллингом* впервые клинически было описано наследственное заболевание фенилкетонурия. И лишь спустя 19 лет установили, что эта болезнь связана с врожденной недостаточностью активности фермента фенилаланингидроксилазы. Это заболевание раньше встречалось с относительно высокой частотой. Частота ее распространения составляла 1:10 000. Сопровождалась она тяжелым исходом — умственным недоразвитием ребенка, возникавшим в первые 2—3 года жизни. Сейчас эта наследственная болезнь изучена достаточно хорошо и для ее предотвращения разработаны действенные способы диагностики и профилактики.

Возникновение ряда анемий у человека связано с наличием у больных людей генов, ответственных за развитие болезни. Например, серповидно-клеточная анемия возникает из-за наличия рецессивной аномальной аллели в генном локусе.

В основе серповидно-клеточной анемии лежит врожденная неполноценность эритроцитов. В таких эритроцитах присутствует до 60—90 % патологического гемоглобина. Патологический гемоглобин обладает пониженной растворимостью, что обусловливает появление эритроцитов серповидной формы, в связи с чем и возникло название болезни.

В 1949 г. *Л. Полинг* (в последующем дважды лауреат Нобелевской премии) вместе с сотрудниками установил, что причиной аномальности в структуре гемоглобина при серповидно-клеточной анемии является замена в молекуле гемоглобина остатка глутаминовой кислоты на остаток валина. Эта замена является результатом генной мутации.

Болезни с наследственным предрасположением отличаются от генных болезней тем, что для их проявления необходимо действие факторов внешней среды. Так же как и для генных болезней, различают моногенные и полигенные заболевания.

Моногенные болезни с наследственным предрасположением характеризуется тем, что предрасположение определяется одним геном, т. е. оно связано с патоло-

гической мутацией одного гена. Для проявления этого предрасположения требуется обязательное действие фактора внешней среды, который по отношению к данной болезни является специфическим.

Полигенные болезни с наследственным предрасположением определяются несколькими генами, каждый из которых является скорее нормальным, чем патологическим. Свое патологическое проявление они осуществляют во взаимодействии с комплексом факторов внешней среды. Любая полигенная болезнь характеризуется наличием большого количества форм, вариантов и клинических проявлений. Эти болезни составляют 90 % хронических неинфекционных заболеваний.

К болезням с наследственным предрасположением относятся например, псориаз, сахарный диабет, шизофрения. Эти болезни в разных странах распространены с разной частотой.

Важное место в борьбе с наследственными заболеваниями имеет их профилактика. Профилактика наследственных болезней может идти по двум путям: уменьшение интенсивности спонтанного мутационного процесса путем антимутагенных воздействий, либо диагностика патологии у плода до его рождения — *пренатальная диагностика*. При проведении пренатальной диагностики выделяют группы беременных повышенного риска развития наследственных болезней. Например, возраст женщин свыше 35 лет является фактором повышенного риска рождения детей с трисомиями (болезнь Дауна).

Наряду со спонтанным возникновением мутаций в организме человека постоянно возникают мутации, индуцированные за счет воздействия химических, физических и биологических факторов внешней среды, количество которых и интенсивность воздействия постоянно увеличиваются в связи с интенсивной индустриализацией. Защита от действий этих факторов также относится к профилактике наследственных болезней.

Из физических факторов известен мутагенный эффект только ионизирующей радиации.

Расчет генетических последствий при мутагенных воздействиях проводится с учетом доз облучения. По определению научного комитета по радиации при ООН дозу радиации, увеличивающую число спонтанных мутаций, вдвое называют удваивающей. При однократном облучении она составляет не менее 0,3—1,5 Гр (грей),



а при многократном — в сумме не менее 1,0—1,5 Гр. Такие дозы получают только в результате несчастных случаев или при очень длительном стаже работы. Анализ потомства лиц, перенесших атомные бомбардировки в Хиросиме и Нагасаки, не показал заметного повышения частоты рождения с наследственной патологией. Согласно этим данным, удваивающая доза радиации у человека составляет свыше 2 Гр.

При таких дозах облучения индуцированный мутационный процесс представляет опасность с точки зрения популяционного, а не индивидуального последствия. Так, если в семье один из супругов получил дозу хронического облучения 1,0—1,5 Гр, т. е. дозу облучения не более удваивающей, то риск появления больного ребенка повысится с 4—5 % до 5—6 %, что все равно является низким значением риска. Поэтому в данной семье можно не ограничивать деторождение. В то же время, если такую дозу получит все население, то, учитывая распространенность воздействия, число больных наследственными заболеваниями через несколько поколений увеличится в 2 раза, что нанесет экономический и моральный урон обществу в течение всех последующих поколений.

Профилактическое лечение наследственных болезней может осуществляться назначением специальных диет, например при наследственных болезнях обмена веществ (фенилкетонурия, недостаточность дисахаридаз) исключение некоторых видов пищи (при целиакии) или



лекарств (при недостаточности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). При этом необходимо помнить, что, чем раньше было начато профилактическое лечение, тем выше положительный эффект от лечения.

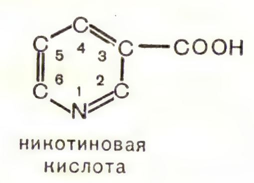
К профилактическим мероприятиям относится и медико-генетическое консультирование. Чаще за консультацией обращаются семьи, где уже имеется ребенок с наследственной патологией или при наличии факторов повышенного риска его появления в связи с наследственными заболеваниями у родственников, кровнородственным браком, возрастом родителей старше 35—40 лет, воздействием мутагенных факторов внешней среды (ионизирующая радиация).

Различают также пороки развития, связанные с нарушением деления клеток, т. е. размножения генетического материала в период внутриутробного развития плода. К таким порокам развития относятся пороки сердца, врожденная расщелина нёба, причинами которых являются неблагоприятные факторы, оказывающие влияние на развитие плода. Интересно, что пороки развития также имеют неравномерное распространение в географическом отношении. Например, частота расщепления губы и нёба в Англии составляет 1 случай на 555 новорожденных, в Японии — 1:333, но врожденный вывих бедра в Японии наблюдается в 10 раз чаще, чем в Англии. В развитии врожденных пороков у человека играет роль комбинация наследственных и экзогенных факторов.

С накоплением экспериментальных и клинических данных было установлено, что содержание нуклеиновых кислот меняется при многих болезнях. Например, у больных язвенной болезнью желудка и хроническим алкоголизмом происходит уменьшение содержания РНК в клетках печени. Это уменьшение указывает на значительные расстройства белоксинтезирующей функции печени и нарушения, которые затрагивают глубокие механизмы этой функции.

Недостаток тех или иных витаминов, имеющих отношение к нуклеотидам, приводит к развитию хронических заболеваний. Рассмотрим два примера недостатка, или, как говорят, дефицита витаминов, входящих в состав коферментов, функционирующих на основе азотистых оснований и представляющих собой нуклеотиды.

Никотиновая кислота имеет следующий вид:



никотиновая
кислота

Она является предшественником никотинамида, входящего в состав никотинамидмононуклеотида, из которого строится, как было отмечено ранее, кофермент дыхательной цепи — никотинамидадениндинуклеотид (НАД). Поэтому никотиновая кислота необходима для человека и многих других млекопитающих. При недостатке никотиновой кислоты в пище у человека развивается характерное заболевание — пеллагра. При пеллагре нарушаются функции центральной нервной системы, желудочно-кишечного тракта. Типичным внешним проявлением пеллагры является воспаление кожи и слизистых оболочек.

Никотиновая кислота используется при лечении атеросклероза. В большом количестве никотиновая кислота находится в различных органах животных: печени, почках, мышцах. Много ее в молоке, рыбе, дрожжах, овощах, фруктах, гречневой крупе.

Витамин B_2 входит в состав флавинмононуклеотида и поэтому также необходим для человека и других

животных. Недостаточность его в организме сопровождается повреждением слизистой оболочки рта и стоматитом.

ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Нуклеиновые кислоты имеют непосредственное отношение к возникновению и развитию многих инфекционных заболеваний. Особенно это относится к заболеваниям вирусного происхождения, когда суть инфекционного процесса заключается в том, что нуклеиновая кислота вирусной частицы проникает внутрь клетки, присоединяется к ДНК этой клетки и в последующем приводит к ее разрушению.

При бактериальных инфекциях многие механизмы заболевания и эффекты действия лекарств также становятся понятными на основе знаний о нуклеиновых кислотах. Например, в ряде случаев внутри больниц возникают вспышки инфекционных заболеваний, поражающие больных, которые находятся в больнице с совсем другими болезнями. Это так называемая внутрибольничная инфекция. Она не поддается лечению антибиотиками, так как инфекция возникает на фоне широкого и интенсивного лечения антибиотиками. Сейчас, в связи с массовым, неумеренным использованием антибиотиков, внутрибольничные инфекции становятся не такими уж редкими.

В результате чего возникает внутрибольничная инфекция? Она развивается в результате возникновения мутаций и изменения генетического кода микроорганизмов. Рассмотрим механизм этого явления на примере развития устойчивости бактерий к антибиотику стрептомицину. Стрептомицин убивает многие свободно встречающиеся в природе, различные формы микроорганизмов, в том числе и стрептококки, которые чувствительны к стрептомицину. Если стрептококки высеять на питательную среду, в состав которой входит стрептомицин, все микроорганизмы погибнут. Однако в тех случаях, когда на микроорганизмы оказывают мутагенное воздействие ультрафиолетовые лучи или мутагенные вещества, иногда на питательной среде, содержащей стрептомицин, обнаруживается рост колоний. Это значит, что отдельные стрептококки стали *стрептомицинрезистентными* — устойчивыми к действию стрептомицина. Данный антибиотик уже не может убить такие



микроорганизмы. И невосприимчивость к действию антибиотиков закрепляется у бактерий наследственно.

Итак, наследственно закрепленная стрептомицинрезистентность возникает в результате мутации. Эта мутация появляется, конечно, не целенаправленно. Она происходит случайно. Но теперь, в присутствии в окружающей среде стрептомицина, выжить могут только те микроорганизмы, у которых была именно эта мутация.

В данном случае мутация оказалась полезной для бактерий, хотя врачам это доставляет много хлопот и беспокойства. Ведь для борьбы с мутированными формами бактерий требуются новые антибиотики с новыми свойствами и спектром действия.

Отсюда возникает и практическая рекомендация, которую пропагандируют органы здравоохранения: запрещается принимать антибиотики без предписания врача. Самолечение антибиотиками приводит к возникновению резистентных штаммов не только стрептококков, но и других микроорганизмов.

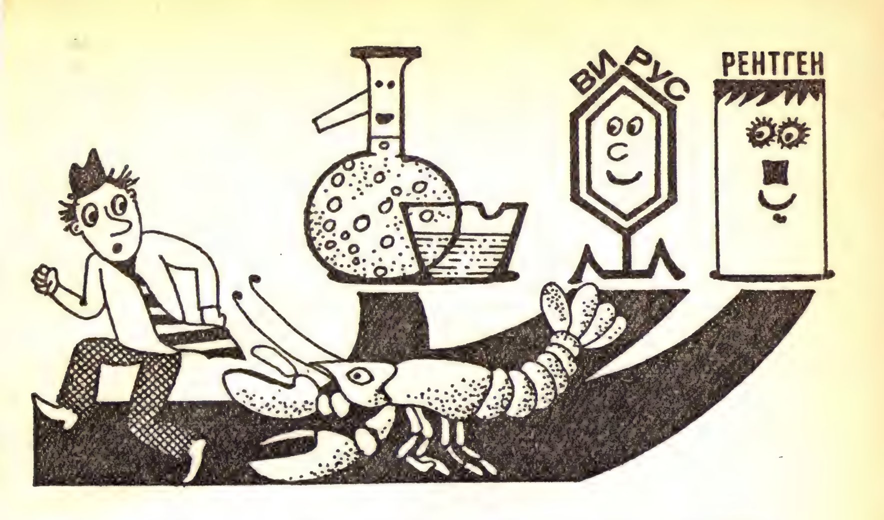
Уже известные вам плазмиды обладают фактором, придающим бактериям устойчивость к антибиотикам. Он называется фактором *R* (англ. *resistance* — устойчивость). В 1955 г. многие страны охватила эпидемия дизентерии, которая была связана с необычайно быстрой эволюцией бактерий и приобретением ими устойчивости ко многим антибиотикам (рис. XXXV). В состав плазмид входит также фактор переноса устойчивости

RTF (*resistance transfer factor*). Маленькие плазмиды фактора *R* лишены области *RTF* и обычно передают клеткам устойчивость только к одному антибиотику. Например, плазмида *R* длиной 8,2 тысячи пар оснований несет ген устойчивости к тетрациклину (*r*). Плазмида *R* не может быть перенесена путем конъюгации. Однако этот ген *r* может присоединиться к другой плазмиде, несущей иной ген устойчивости к какому-либо веществу (рис. IX). Если ген *r* объединяется с плазмидой, содержащей область *RTF*, возникает плазмида, содержащая ген *r* и способная переходить в другие клетки при конъюгации. Следовательно, плазмиды имеют несколько факторов *R*, образующихся из подвижных элементов. Такие плазмиды обусловливают устойчивость бактерий к отдельным химическим соединениям. Такие генетические элементы, способные к переносу, теперь называют *транспозонами*.

Важное значение для борьбы с инфекционными заболеваниями имеет выработка организмом антител. Они необходимы для защиты организма от различных инфекций. Антитела образуются тогда, когда в организм попадает антиген. Антиген попадает в клетку. На основе физико-химических свойств формируется третичная структура (конфигурация) иммуноглобулина таким образом, что он становится способным специфически связывать именно этот антиген. Поэтому антитело должно иметь по крайней мере два специфических центра связывания для захвата двух антигенов и их преципитации (осаждения). На рис. XXI представлена схема возникновения специфической конфигурации центра связывания около антигена, сидящего на поверхности рибосомы. Непосредственное формирование центра связывания осуществляется на так называемой детерминантной группе антигена, предназначенной для специфического распознавания антигена.

РАЗВИТИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Проблема развития злокачественных опухолей давно привлекает внимание ученых и является на сегодняшний день актуальной для всего человечества. В чем же причина развития злокачественного роста клеток? По существующим сведениям нормальная клетка становится раковой под действием либо одного, либо комби-



нации факторов: химических канцерогенных веществ, ионизирующего облучения и онкогенных вирусов, т. е. вирусов, вызывающих рак.

Мутагены, которые с достаточно большой частотой вызывают развитие злокачественных опухолей, называются *канцерогенами*. Под действием канцерогенов любой природы происходит повреждение дезоксирибонуклеопротеидов. К таким повреждениям относятся частичная диссоциация ДНК, образование сшивок между ДНК и окружающими ее белками, распад нуклеопротеидов.

Количество химических канцерогенных веществ в связи с развитием промышленного производства постоянно увеличивается, что ведет к загрязнению окружающей среды. Средством защиты от такого загрязнения является создание эффективной системы контроля. Создание системы контроля имеет огромное значение для профилактики рака. Это особенно важно, если учесть, что около 80 % случаев злокачественных опухолей обусловлены действием канцерогенов, находящихся в окружающей среде. Загрязнением окружающей среды объясняют отчасти различия в распространенности отдельных видов рака. Например, было установлено, что рак печени в Кении встречается значительно чаще, чем в европейских странах. При эпидемиологическом обследовании населения этой страны обнаружено, что существует связь между частотой возникновения рака печени и содержанием в продуктах афлатоксина, ве-

щества, образующегося в результате жизнедеятельности особого вида плесени, характерной для влажного жаркого климата.

Но наиболее серьезными канцерогенами по распространенности и последствиям являются канцерогены табачного дыма. В табаке содержатся специфические нитрозамины (например, нитрозонорникотин), обладающие высокой канцерогенной активностью. В многочисленных исследованиях достоверно установлено, что курение является фактором риска развития рака легких. Такое увеличение частоты установлено как у женщин, так и у мужчин. Полагают, что курение сигарет является основным фактором в развитии рака полости рта, красной каймы губ, глотки и причиной предраковых состояний этих органов. Отказ от курения считается чрезвычайно важным моментом с точки зрения первичной профилактики рака гортани. Курение — фактор риска развития рака мочевого пузыря. У людей, выкуривающих в день 60 сигарет и более, он развивается в 2,8 раза чаще, чем у некурящих. Курение может также способствовать развитию рака предстательной железы.

Чем раньше человек начинает курить, тем выше у него вероятность заболевания. Рак поджелудочной железы у курящих мужчин развивается в 2,4 раза, а у курящих женщин в 1,8 раза чаще, чем у некурящих. При этом имеет значение интенсивность курения: чем



больше человек курит, тем выше вероятность развития у него рака поджелудочной железы.

Из этого можно сделать вывод, что канцерогены, входящие в состав табака, ответственны за значительную часть злокачественных опухолей разных органов. Это обнаружено в исследованиях, проведенных в разных странах. Подсчитано, что в случае полного исключения курения из обихода число случаев рака уменьшится на 25—40 %. Некурящий 25-летний мужчина может пережить своего ровесника, выкуривающего 20—30 сигарет в день, в среднем на шесть с половиной лет. Борьба с курением способствует снижению заболеваемости злокачественными опухолями.

В 1974 г. было обнаружено, что винилхлорид — исходный продукт, применяемый при изготовлении поливинилхлорида в производстве пластических масс, обладает канцерогенными свойствами. Сам поливинилхлорид не канцерогенен, но он может содержать следы (несколько частиц на миллион) винилхлорида. Реальная опасность существует на предприятиях, имеющих дело с винилхлоридом. Однако вообще прекратить производство поливинилхлорида общество не может и приходится мириться с тем, что работа на предприятиях, выпускающих столь нужные всем изделия из поливинилхлорида, сопряжена с некоторым риском (как оно мирится с тем, что шахтеры, добывающие уголь, также подвергаются опасности).

Другой важный вопрос, относящийся к возникновению и развитию злокачественных опухолей, заключается в том, вызывает ли вирус раковые заболевания у человека. Известно, что вирус является возбудителем различных заболеваний: кори, ветряной и натуральной оспы, коклюша, полиомиелита, гриппа.

Считается, что некоторые вирусы могут быть причиной развития злокачественных опухолей. Такие вирусы называются *онкогенными*. Известен *аденовирус* обезьян, который обладает высокой способностью вызывать рак. ДНК этого вируса имеет участок, несущий *«онкоген»*, т. е. ген, ответственный за раковое перерождение клеток.

Механизм развития злокачественных опухолей при действии вирусов заключается в следующем. На начальном этапе происходит внедрение РНК вируса в ядро нормальной клетки. Чтобы генетическая информация из РНК транскрибировалась в ДНК клетки-хозяина,

необходимо присутствие специальных ферментов, осуществляющих синтез соответствующей ДНК по схеме РНК вируса. Такие ферменты называются *ревертазами* или обратными транскриптазами. Синтез с помощью ревертаз осуществляется довольно быстро. Затем синтезированная ДНК включается в ДНК генома клетки. Но для функционирования ревертазы необходимо, чтобы с РНК вируса была связана молекула РНК. При тщательном изучении свойств этих молекул было установлено, что это *т*РНК. Например, при развитии опухоли у птиц, вызванной вирусом саркомы Рауса, такой РНК является триптофановая *т*РНК, т. е. *т*РНК, переносящая аминокислоту триптофан, а если заболевание вызывается вирусом лейкемии мышей — пролиновая *т*РНК.

Таким образом, некоторые *т*РНК выступают в совершенно новой для них роли. Они принимают участие в злокачественном перерождении клеток под действием онкогенных вирусов.

Существует вирус, названный по фамилии открывших его ученых, — вирус Эпштейна — Барра. Его обнаружили в раковых клетках больных, страдающих раком носоглотки и лимфомой Беркитта (появление крупных опухолей на челюсти). Рак носоглотки широко распространен среди жителей южных районов Китая, в Сингапуре, Гонконге, но редко встречается в других местах. Лимфома Беркитта часто диагностируется в экваториальных районах Африки (Уганда), где она поражает детей в возрасте 6—8 лет. Иммунологические исследования проб крови, взятых у таких больных, свидетельствуют о наличии вируса Эпштейна — Барра в их организме. Однако прямых доказательств того, что именно этот вирус вызывает оба раковых заболевания у южных китайцев и детей Уганды, пока нет. Исследователям из США удалось вызвать у обезьян, инфицированных вирусом Эпштейна — Барра, заболевание, во многих отношениях подобное лимфоме Беркитта.

В развитии злокачественных опухолей как вирусной, так и химической природы имеет значение генетическая предрасположенность к их развитию. Учеными была изучена генетическая конституция одной из групп населения, которое отличается большей уязвимостью в отношении рака носоглотки, чем живущие по соседству группы населения. С помощью особых методов исследования удалось обнаружить тонкие генетические

различия между больными раком носоглотки и здоровыми членами первой группы. Можно предположить, что в группе с генетической конституцией, обусловливающей предрасположенность к раку носоглотки, встречаются особо уязвимые в отношении развития этого заболевания лица.

Следовательно, если два лица, у одного из которых есть предрасполагающий ген, а у другого его нет, будут подвергаться действию одного и того же канцерогена, будь то вирус или химическое вещество, вероятность возникновения рака носоглотки в первом случае окажется намного больше, чем во втором.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ВОЗРАСТ

С развитием представлений о нуклеиновых кислотах как основной форме передачи и хранения генетической информации новое направление получила и геронтология — наука о старении организмов. Многочисленные исследования, проведенные в этой области, показали несомненную связь старения с обменом нуклеиновых кислот.

Например, стало известно, что синтез ДНК в клетке новорожденных происходит интенсивнее, чем у взрослых. Более того, при изучении обмена нуклеиновых кислот в эмбриогенезе установлено, что синтез РНК также происходит неравномерно. Синтез РНК усиливается в начальный период развития эмбриона. В этот же период у эмбриона появляется несколько новых антигенов, что было доказано с помощью иммунологических методов.

У старых животных повышен синтез однонитевой ДНК, а процесс формирования двунитевой ДНК в регенерирующей ткани печени замедляется. Это означает, что у старых животных за каждый промежуток времени меньшее количество образующейся ДНК переходит в двуспиральную структуру, чем у молодых животных. Это явление может объяснить склонность к опухолеобразованию у старых особей.

Связь между скоростью изменения структуры нуклеиновыми кислотами и возрастом особи обнаружена не только для ДНК, расположенной в ядре, но и для ДНК, расположенной в других частях клетки. Например, митохондрии имеют собственную ДНК, которая обеспечивает синтез многих митохондриальных белков. При

старении собственная ДНК митохондрий начинает работать хуже, что проявляется в снижении синтеза митохондриальных белков. В то же время синтез митохондриальных белков, которые кодируются ядерной ДНК, не снижается в процессе старения. Было показано, что такое снижение синтеза белка сочетается со снижением репликативной активности ДНК митохондрий.

Репликативная активность представляет собой показатель скорости удвоения нити ДНК. Его определяют следующим образом. В инкубационную среду, где выращивают клетки, добавляют нуклеотид тимидин, один из атомов водорода в котором является радиоактивным. Такой тимидин называют «меченый тритием тимидин» или иначе ^{3}Н-тимидин. Нити ДНК, которые удваиваются в процессе жизнедеятельности клетки, захватывают этот меченый тимидин, а в ДНК, которая не удваивается, тимидин отсутствует. Затем все клетки помещают над фотопластинкой. Если в состав ДНК входит радиоактивный изотоп атома водорода, то фотопластинка засветится. Радиоактивный изотоп водорода в данном случае выступает в качестве метки вновь синтезированной нити ДНК. По числу участков засвечивания судят об интенсивности репликации ДНК, о ее репликативной активности. Снижение репликативной активности ДНК митохондрий при старении указывает на снижение энергетического обмена в клетке, что имеет негативные последствия для всего организма в целом.

В последнее время было показано, что в печени молодых крыс имеется резерв *и*РНК и рибосом, которые при старении организма вовлекаются в синтез белка. Было высказано предположение, что у старых животных используется весь резервный потенциал белоксинтезирующего аппарата. При этом резерв *и*РНК переходит из неактивной в активную форму.

РЕГЕНЕРАЦИЯ

Обмен нуклеиновых кислот меняется и при многих восстановительных процессах, протекающих в организме в ответ на воздействие повреждающих факторов. Например, в процессе регенерации (восстановления) печени в ее клетках значительно возрастает содержание нуклеиновых кислот, и в частности РНК. Это ука-

зывает на повышение белкового синтеза, что, по-видимому, является компенсаторным (защитно-приспособительным) механизмом в ответ на повреждение печени.

ДИАГНОСТИКА

Специфические ферменты, расщепляющие нуклеиновые кислоты, в частности нуклеазы, нашли широкое применение в медицине как для диагностики, так и для лечения заболеваний. Например, определяя активность нуклеаз, можно диагностировать ряд заболеваний.

Увеличение активности дезоксирибонуклеазы в сыворотке крови наблюдается при остром панкреатите, т. е. при воспалении поджелудочной железы. Знание активности дезоксирибонуклеазы позволяет оценивать степень тяжести состояния больного при остром воспалении в поджелудочной железе.

Значение нуклеаз возрастает еще и в связи с тем, что при доброкачественном росте клеток активность нуклеаз в клетках повышается (рост плаценты, регенерация печени, размножение микроорганизмов), а при злокачественном росте клеток активность нуклеаз, и в частности ДНК-аз, снижается.

Повышение активности рибонуклеазы в сыворотке крови отмечено при хронической почечной недостаточности, сопровождающейся уремией — состоянием, при котором в организме больного происходит накопление токсичных продуктов обмена веществ, например мочевины.

Повышение активности рибонуклеазы в сыворотке крови отмечено при хронической почечной недостаточности, сопровождающейся уремией — состоянием, при котором в организме больного происходит накопление токсичных продуктов обмена веществ, например мочевины.

Оценка скорости синтеза ДНК используется в иммунологическом исследовании, например в реакции смешанной культуры лимфоцитов двух людей. С помощью этого теста исследуют реакцию лимфоцитов на *аллоантигены,* т. е. антигены внутри одного вида, но от разных организмов. Эта реакция важна при подборе донора для проведения трансплантации. Чем выше иммунная реакция лимфоцитов, тем выше интенсивность синтеза ДНК.

В широком смысле диагностика в здравоохранении



включает не только методы оценки здоровья конкретного человека, но и методы оценки «здоровья» окружающей среды.

Знания о нуклеиновых кислотах послужили основанием для разработки методов охраны и контроля за окружающей средой, мер техники безопасности при работе с радиоактивными и химическими веществами. Проверка веществ на мутагенность важна и необходима даже по той причине, что в мире ежегодно появляется около 40 000 новых химических соединений, причем сотни из них получают широкое распространение в быту. К тому же существует множество химических веществ, уже интенсивно используемых в различных областях деятельности человека, но пока не получивших проверки своих свойств относительно мутагенности.

При действии физических и химических мутагенов на ДНК в ней развиваются различные повреждения. Эти повреждения могут приводить к изменению свойств клетки и организма в целом, могут вызывать гибель клетки вследствие повреждения ДНК, а в ряде случаев приводить к злокачественному перерождению клеток.

Существуют стандартные методы оценки мутагенных свойств сразу большого числа проб. Принцип этих методов основан на том, что мутагенные вещества вызывают мутации у бактерий и за счет этого изменяют свойства их колоний. Практически все вещества, вызывающие развитие злокачественных опухолей у экспери-

ментальных животных, могут также вызывать мутации у бактерий. Регистрируя появление мутаций, можно оценить степень мутагенности анализируемого химического вещества.

Учеными предложен быстрый и простой метод оценки мутагенов с использованием светящихся морских бактерий. Эти бактерии в норме излучают свет. На первом этапе использования этого метода отбирают вариант морских фотобактерий, естественным путем утративших способность светиться. При инкубации этих бактерий с соединениями, вызывающими мутации ДНК, биолюминесценция бактерий восстанавливается.

При изучении инфекционных заболеваний путем проведения иммунологических анализов нетрудно установить, что в развитии данной инфекции основную роль сыграл определенный вирус. Его идентифицируют, например, в крови человека с помощью антител, специфичных данному белку. Антитела создают на основании выделения чистых фракций белков. Особенно перспективными являются моноклональные антитела. Моноклональные антитела можно использовать не только для идентификации инфекционного агента, но и для выделения именно того белка, который ответствен за развитие данной болезни. Как получаются моноклональные антитела?

Впервые в 1975 г. Г. Келер и К. Мильштейн разработали методику получения *гибридом* — клеточных гибридов от слияния нормальных лимфоцитов иммунизированных животных с культивируемыми в питательной среде клетками миеломных штаммов. Были использованы такие штаммы клеток, которые не содержали фермента гипоксантинфосфорибозилтрансферазы. Такие клетки быстро погибали в питательной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Лимфоциты же в этой среде не гибли. Слияние лимфоцитов с миеломными клетками осуществляется под действием полиэтиленгликоля. Слившиеся гибридомные клетки получают от лимфоцитов способность синтезировать определенные антитела и способность выживать в среде с гипоксантином, аминоптерином и тимидином. От миеломных клеток они получают способность бесконечно размножаться в искусственных условиях. Накопившиеся гибридомные клетки могут быть размножены. Эти клетки составляют так называемый *клон*. Отсюда и образовавшиеся антитела получили название моноклo-

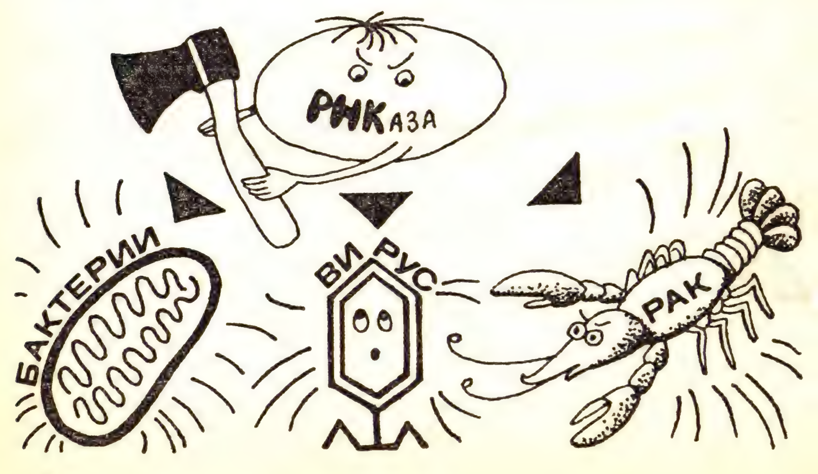
нальных антител. Моноклональные антитела идентичны по всем параметрам: по классу молекулы, по ее типу, по специфичности — они взаимодействуют только с одним антигеном. Синтезированные клоном антитела могут быть получены в неограниченном количестве. Таким образом, полученный в пробирке или в клеточном реакторе препарат может служить идеальным реагентом по специфичности на то или иное органическое вещество, идеальным диагностическим или лечебным средством. Набор специфических антител, которые можно будет получить, неограничен.

Преимущество использования моноклональных антител перед другими иммунными препаратами настолько очевидно, что сейчас уже организуются учреждения по производству моноклональных антител в качестве диагностических и лечебных препаратов.

ЛЕЧЕНИЕ

Нуклеазы используют в диагностике и лечении некоторых заболеваний. Эффект нуклеаз связан с расщеплением молекул ДНК и РНК в патогенных и измененных клетках, а также в вирусах.

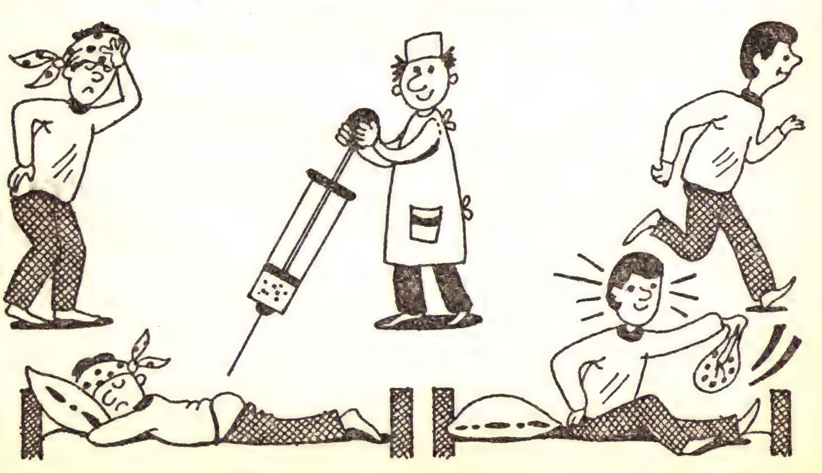
ДНК-азы способны проникать через клеточные мембраны без потери биологической активности. Эта способность является весьма существенной с учетом той их биологической роли, что ДНК-азы выступают в качестве защитных факторов организма в случае проникно-



вения во внутреннюю среду организма чужеродных нуклеиновых кислот.

Дезоксирибонуклеазу используют для лечения вирусных инфекционных заболеваний, вызванных в основном аденовирусами и вирусами герпеса. ДНК-азу используют также для лечения процессов нагноения. При этом также происходит расщепление ДНК, на этот раз бактериальных клеток, вызвавших нагноительный процесс. Препараты дезоксирибонуклеазы находят применение при лечении некоторых заболеваний нервной системы, например при лечении такого грозного по прогнозу и осложнениям заболевания, как менингит.

Препараты рибонуклеазы с успехом используются при лечении клещевого энцефалита, а также для лечения опухолевых заболеваний. Принцип действия РНК-азы основан на проникновении этого фермента внутрь клеток и разрушении РНК. При этом выключается основное звено в белок синтезирующей структуре клетки. Нарушается передача генетической информации с ДНК на систему, синтезирующую белок. Пока опухоли лечат у экспериментальных животных. Но недалек тот час, когда РНК-азы начнут использовать и в клинике. Сейчас разрабатываются более совершенные модификации РНК-азы, так называемые димеры рибонуклеазы. Пример представляет собой соединение двух РНК-аз. Установлена повышенная противоопухолевая активность димеров РНК-азы. В опытах на мышах с привитой саркомой при внутрибрюшинном введении димера было выявлено значительное увеличение



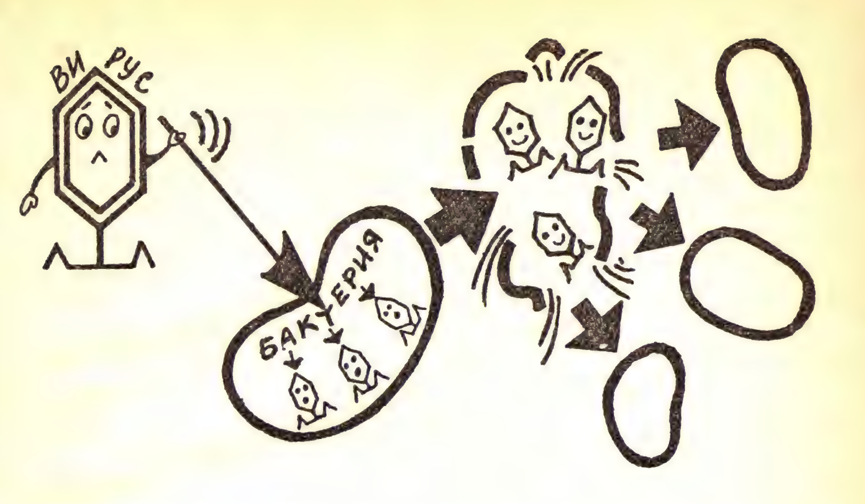
продолжительности жизни животных, что практически не наблюдалось при введении обычной РНК-азы. При лечении мышей с развитым лейкозом зафиксировано исчезновение 50 % узлов в лимфоидных органах и селезенке. Действие же мономера при аналогичном исследовании было незначительным.

Важным явлением в лечении многих заболеваний является применение сывороток, содержащих антитела. Однако полученная иммунизацией животных сыворотка дает много осложнений. Поэтому в последнее время для широкого применения предлагают моноклональные антитела.

Одним из направлений практического использования знаний о нуклеиновых кислотах является разработка и применение в практической медицине бактериофагов. *Бактериофаг* — это вирус, убивающий бактерии. В настоящее время созданы и производятся промышленностью препараты бактериофагов для лечения многих инфекционных заболеваний: брюшного тифа, дизентерии, сальмонеллеза, стафилококковой и стрептококковой инфекции.

Что же представляет из себя бактериофаг? На рисунке XXII видно, что он состоит из капсулы, в которой расположена нуклеиновая кислота, и дополнительных структур, обеспечивающих проникновение этой нуклеиновой кислоты внутрь бактерии. Попав в бактериальную клетку и включившись в ее геном, вирусная нуклеиновая кислота вызывает нарушение обмена этой клетки и ее гибель. Одновременно происходит синтез новой вирусной нуклеиновой кислоты и сборка вирусной частицы, включая и ее белковый компонент. Получается так, что, попав внутрь микроорганизма, бактериофаг так меняет ее метаболизм, что бактериальная клетка начинает сама синтезировать своего смертельного врага — специфический бактериофаг. Такое размножение бактериофага происходит до тех пор, пока в окружающей среде сохраняются специфичные для него бактерии. Затем бактериофаг гибнет.

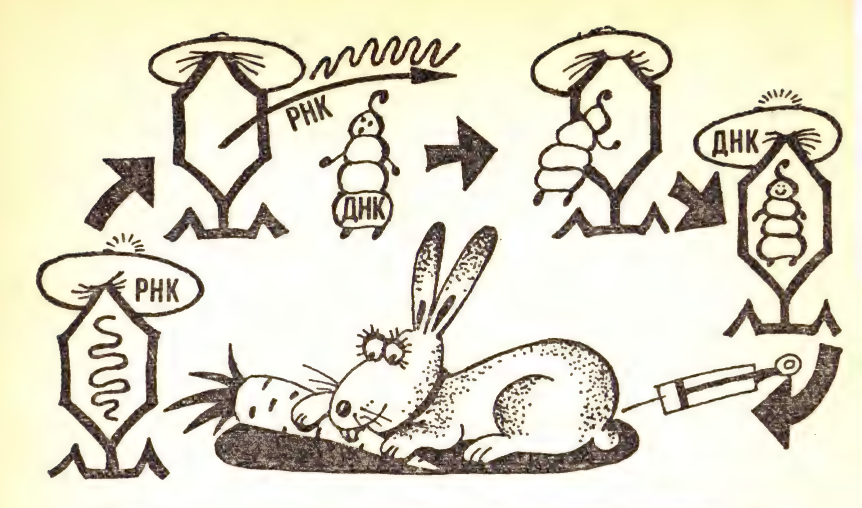
Весьма эффективны в плане иммунизации живые вирусные и бактериальные вакцины с пониженными болезнетворными свойствами. В отличие от пептидов и очищенных белков, получаемых при промышленном культивировании бактерий с измененными генетическими свойствами, такие вакцины не требуют применения дополнительных веществ, усиливающих их действие.



В настоящее время некоторые вирусы начинают использовать в качестве проводников других антигенов. При этом оболочку вируса сохраняют, а в его геном вводят новый сегмент ДНК с требуемыми антигенными свойствами или производят полную замену исходного генома на новый. Например, широко ведутся работы с вирусом коровьей оспы. ДНК, кодирующая антигены вируса гепатита В, была внесена в вирусную частицу коровьей оспы. Затем этот вирус с новым геномом был введен кроликам. В результате такого эксперимента у кроликов наблюдалась длительная выработка антител к вирусу гепатита.

Знание путей синтеза азотистых оснований позволило разработать и предложить для практического использования ряд веществ, которые специфически блокируют отдельные участки их синтеза. Такие вещества, блокируя синтез нуклеотидов у бактерий, применяют для лечения различных инфекций. Установлено, что в биосинтезе пуринов до стадии образования инозиновой кислоты — непосредственного предшественника пуринов — имеются по крайней мере три участка, которые специфически ингибируются антибактериальными агентами.

Например, антибиотик азасерин специфически блокирует перенос амидной группы глутамина на фосфорибозил-пирофосфат. Этот антибиотик выделен из лучистого гриба — актиномицеты. Азасерин по существу является структурным аналогом глутамина и конкури-



рует с ним при построении пуринового кольца. Азасерин, кроме того, принимает участие еще в двух стадиях синтеза инозиновой кислоты. Он ингибирует перенос аминогруппы глутамина на формилглицинамид-рибонуклеотид, а также блокирует сульфгидрильные группы (—SH) ферментов, катализирующих все эти реакции синтеза инозиновой кислоты. Сульфгидрильные группы имеют важное значение для работы этих ферментов.

Представлены структурные формулы некоторых антибактериальных препаратов и их аналогов:

$$N{\equiv}N{=}CH{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}{-}O{-}CH_2{-}\underset{\underset{\large NH_2}{|}}{CH}{-}COOH$$

азасерин

$$H_2N{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}{-}CH_2{-}CH_2{-}\underset{\underset{\large NH_2}{|}}{CH}{-}COOH$$

глутамин

$$H_2N{-}C_6H_4{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{\underset{\underset{\large O}{\|}}{S}}{-}NHR$$

сульфамид

$$H_2N{-}C_6H_4{-}COOH$$

п-аминобензойная кислота

К ингибиторам белкового синтеза относятся и более сложные по строению вещества. Например, стрептомицин, хлорамфеникол (препарат левомицетин), циклогексимид:

циклогексимид

хлорамфеникол

стрептомицин

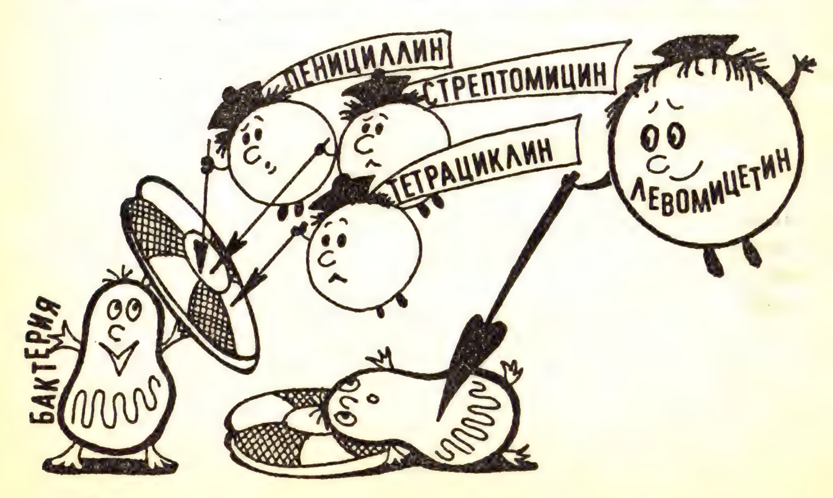
Антибиотики левомицетин и циклогексимид подавляют образование пептидной связи при синтезе белков. Наряду с широким применением в лечебной практике эти соединения используются также для изучения механизма регуляции белкового синтеза в различных исследовательских работах.

Механизм действия левомицетина заключается в том, что он подключается к одной из субъединиц рибосомы. Это ведет к замедлению синтеза белка на рибосоме клеток микроорганизмов. Именно в ингибировании синтеза белка за счет соединения с рибосомами заключается механизм антимикробного действия левомицетина и проявляется его характерное свойство — широкий спектр антимикробного действия. Он эффективен в отношении многих бактерий. При этом левомицетин не ингибирует синтез белка на рибосомах клеток эукариот.

Одним из наиболее распространенных антибиотиков,

используемых в качестве антибактериального средства, является стрептомицин. Стрептомицин обладает широким спектром антибактериальной активности. Он эффективен в отношении многих бактерий, вызывающих самые разнообразные инфекционные заболевания у человека и подавляет рост стафилококков, стрептококков, гонококков, возбудителей дизентерии, чумы и туберкулеза. Чаще стрептомицин вводят внутримышечно, так как он плохо всасывается из желудочно-кишечного тракта. Стрептомицин обладает бактерицидным эффектом, т. е. он не просто тормозит рост бактерий, но и приводит к их разрушению, распаду. С чем же связан бактерицидный эффект стрептомицина?

Такое действие стрептомицина объясняется тем, что он взаимодействует с нуклеиновыми кислотами. Стрептомицин присоединяется к одной из субъединиц рибосомы. В мутантных клетках, имеющих резистентность к стрептомицину или нуждающихся в нем, изменяется генетическое кодирование этой субъединицы рибосом. Стрептомицин так изменяет конфигурацию рибосомы, что аминоацил-*т*РНК, т. е. активированная *т*РНК, образующая комплекс с аминокислотой, менее прочно связывается с триплетом *и*РНК, расположенным на рибосоме. Менее прочное присоединение *т*РНК означает также утрату до некоторой степени специфичности этой *т*РНК. Такая утрата специфичности приводит к тому, что при считывании генетического кода с *и*РНК возникают ошибки и строятся белки с измененными,

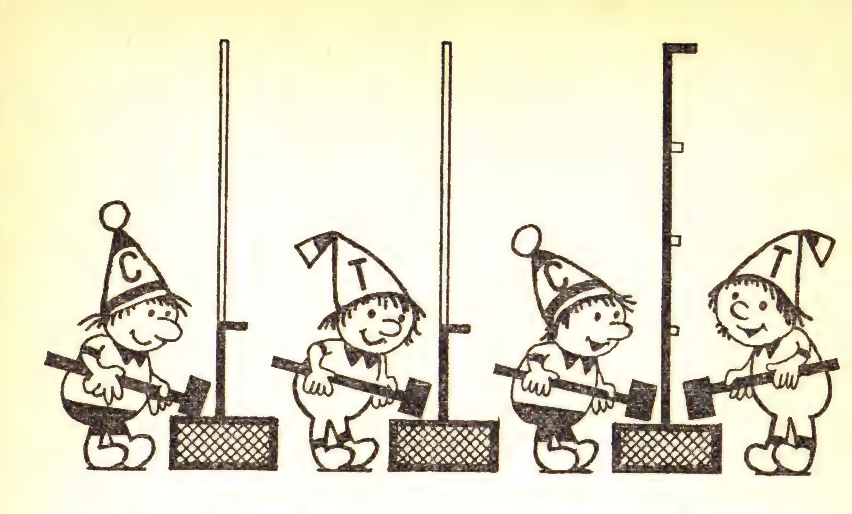


нарушенными свойствами. В конечном счете это ведет к гибели бактериальной клетки.

Некоторые антибиотики являются специфическими ингибиторами транскрипции. К ним относятся, например, антибиотик актиномицин D, содержащий полипептиды антибиотика, продуцируемого актиномицетами. Находясь в клетке в небольшом количестве, актиномицин подавляет только транскрипцию и не оказывает влияния ни на репликацию ДНК, ни на непосредственный синтез белка. Таким образом, ингибирование белкового синтеза опосредуется через блокирование синтеза *и*РНК. Без *и*РНК не могут осуществляться процессы белкового синтеза. Полипептидная цепочка не будет образовываться, так как нет кодирующей информации, с которой могла бы считываться информация о последовательности аминокислот. Тем не менее в экспериментальных условиях синтез белка протекает некоторое время после добавления актиномицина D. Синтез продолжается до тех пор, пока не разрушится исходная, первоначальная *и*РНК, которая легко гидролизуется нуклеазами и поэтому существует непродолжительное время. Это ведет к тому, что при добавлении актиномицина ингибирование белкового синтеза происходит не сразу.

Молекулярный механизм действия актиномицина заключается в том, что он связывается с двухспиральной ДНК и за счет этого подавляет ее свойством как матрицы для синтеза *и*РНК. Актиномицин состоит из двух одинаковых циклических пептидов, соединенных феноксазоновой системой колец (рис. XVII). В состав этих циклических пептидов входит саркозин, метилвалин и валин. Актиномицин не соединяется с одноцепочечными ДНК или РНК, двухспиральными РНК. Связь актиномицина с ДНК усиливается, если в ДНК увеличивается содержание остатков гуанина. При исследовании комплексов антибиотика с ДНК установлено, что феноксазоновое кольцо антибиотика проникает в ДНК между двумя соседними парами оснований (рис. XXX). Такой способ внедрения называется *интеркаляцией*.

В медицине для подавления роста многих бактерий в качестве антибактериальных агентов широко используются сульфаниламидные препараты. Они ингибируют образование фолиевой кислоты, принимающей участие в синтезе пуриновых оснований. Такое ингибирование



синтеза фолиевой кислоты сульфаниламидами объясняется тем, что они представляют собой структурные аналоги пара-аминобензольной кислоты, являющейся предшественником фолиевой кислоты. Сульфаниламиды вступают в конкуренцию за место в структуре фолиевой кислоты и таким образом тормозят нормальное ее формирование. Такое торможение называется конкурентным ингибированием. В результате конкурентного ингибирования сульфамидами не происходит нормального встраивания пара-аминобензойной кислоты в фолиевую кислоту.

Особое значение имеет *комплексное* использование различных антибактериальных препаратов, механизм действия которых основан на специфическом ингибировании разных участков пути синтеза нуклеиновых кислот. Такие препараты по эффективности действия превосходят даже суммарный эффект, который может быть получен от применения каждого их этих препаратов в отдельности.

Примером такого препарата может служить бисептол. Бактрим представляет собой комбинированный препарат, в состав которого входят два действующих вещества: сульфаметоксазол, относящийся к сульфамидам, и триметоприм, являющийся производным диаминопиримидина. Структурные формулы этих веществ представлены:

сульфаметоксазол

триметоприм

Сульфаметоксазол, как и триметоприм, являются антибактериальными препаратами и ничем существенно не отличаются от других, родственных им препаратов. Но в сочетании их антибактериальный эффект значительно превышает сумму антибактериального действия каждого препарата, взятого в отдельности.

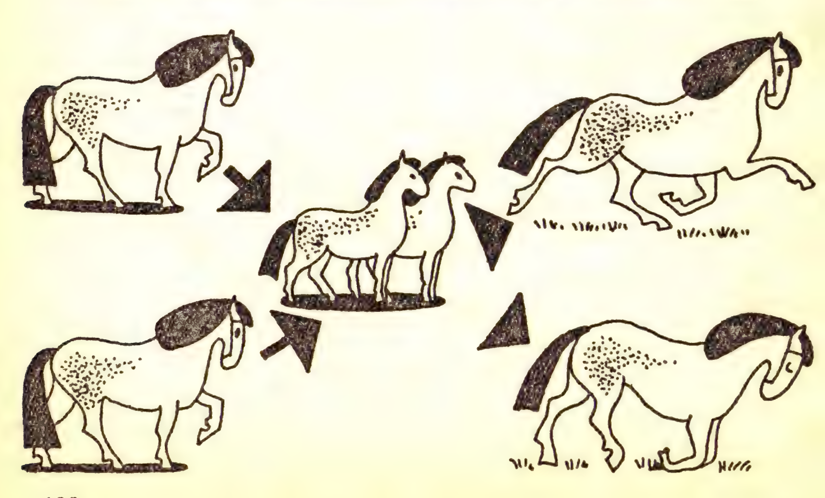
Таким образом, знания о нуклеиновых кислотах позволили объяснить многие явления в медицине и разработать новые средства диагностики и лечения.

Глава 7

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗНАНИЙ О НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Современное развитие сельского хозяйства немыслимо без знаний о нуклеиновых кислотах. Эти знания используются практически во всех областях сельского хозяйства. Они помогают разработать научно обоснованные рекомендации по содержанию домашних животных и растений, профилактике и лечению различных болезней. Данные, полученные при изучении ДНК и РНК, используются при выведении новых, устойчивых к заболеваниям, продуктивных пород животных и сортов растений.

Селекция, гибридизация, выведение новых пород животных и сортов растений — все это базируется на теоретических сведениях о нуклеиновых кислотах, объединенных в научно-практическом аспекте в сельскохозяй-



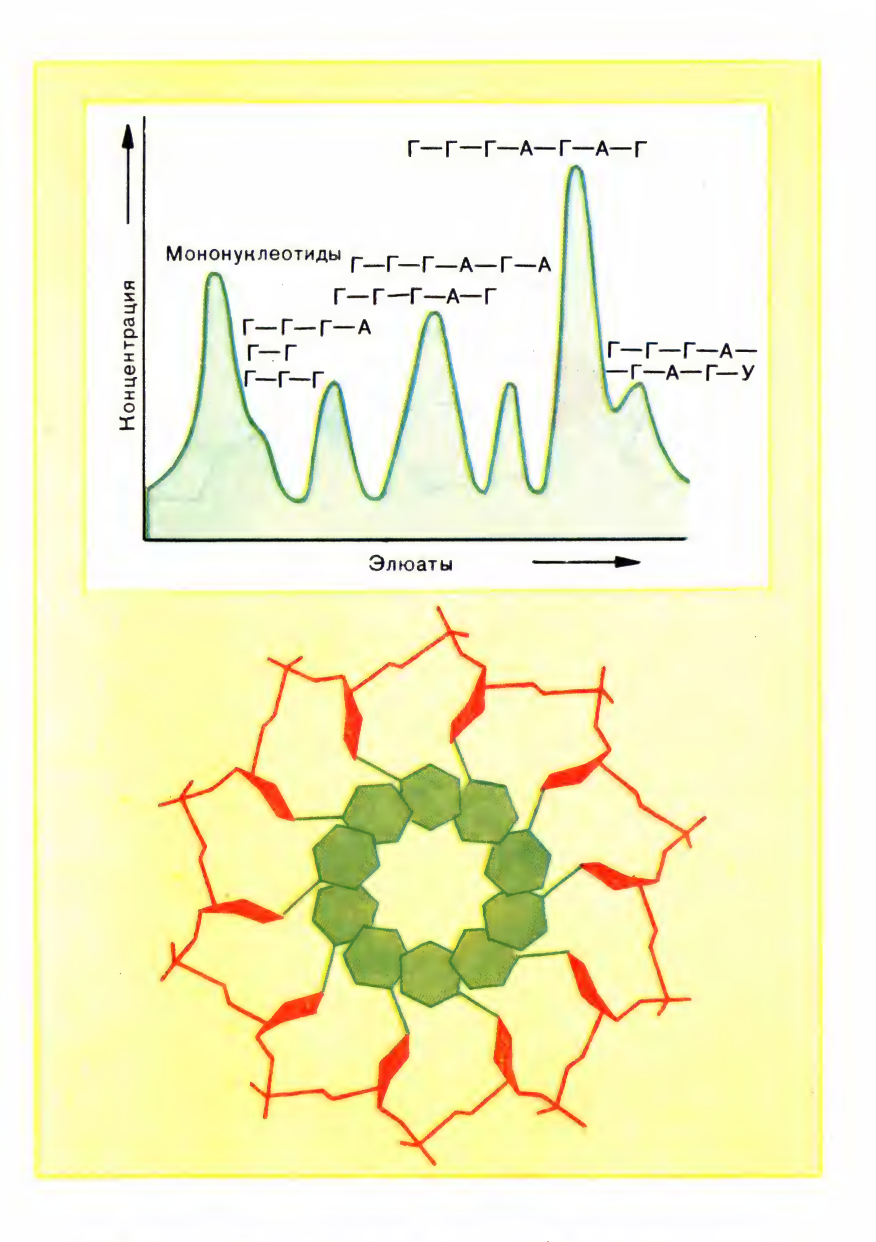


Рис. I. Хроматографический анализ нуклеотидной последовательности тРНК.

Рис. II. Схема одной из цепей двойной спирали ДНК.

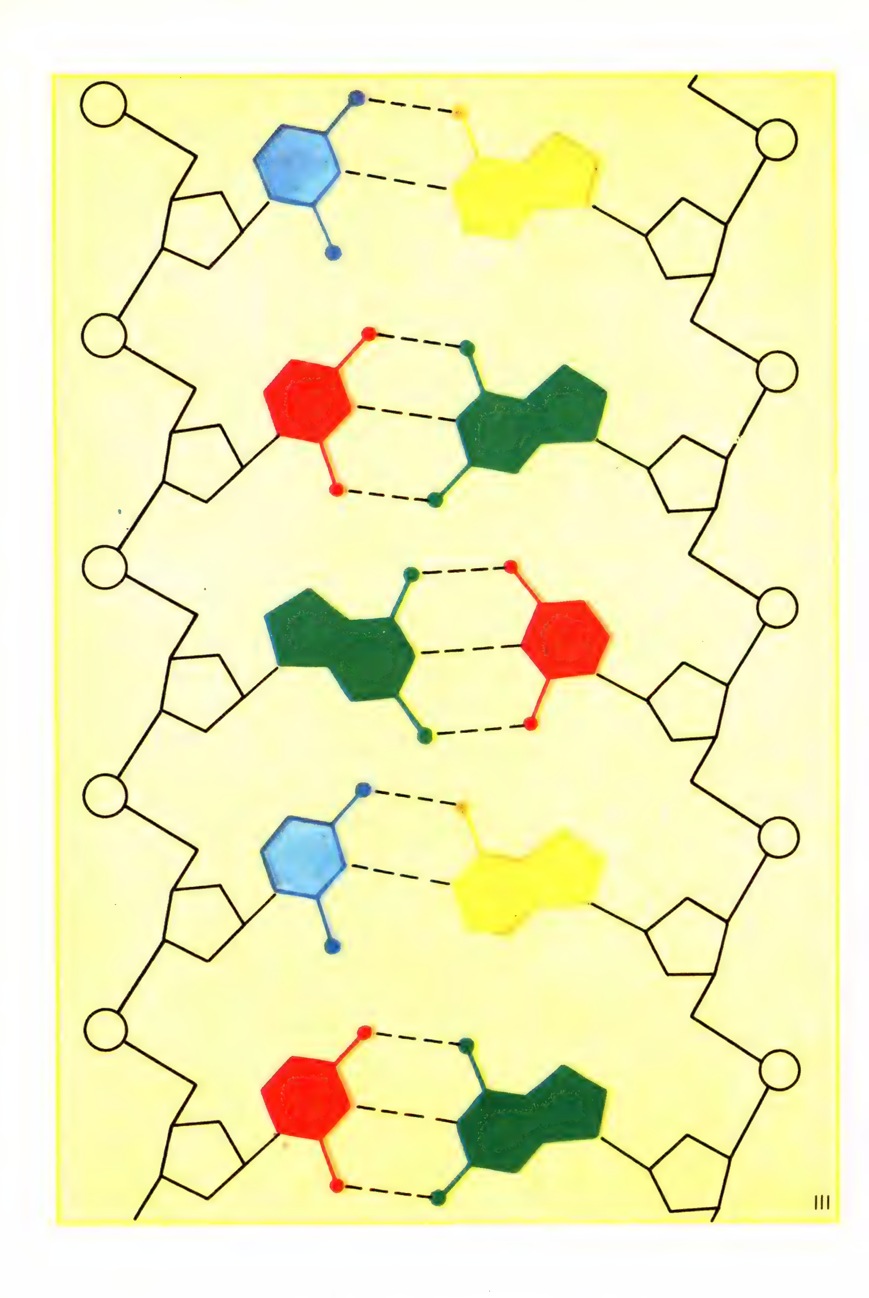


Рис. III. Схема структуры ДНК.

2 нм

4 нм

10 нм

IV

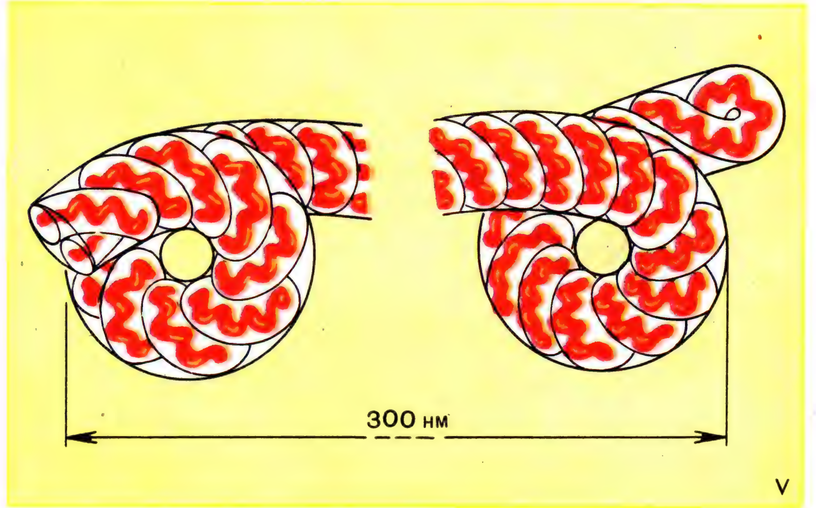


Рис. IV. Закручивание спирали ДНК после наложения гистоновых белков.

Рис. V. Суперспирали из тяжей ДНК диаметром 10 нм.

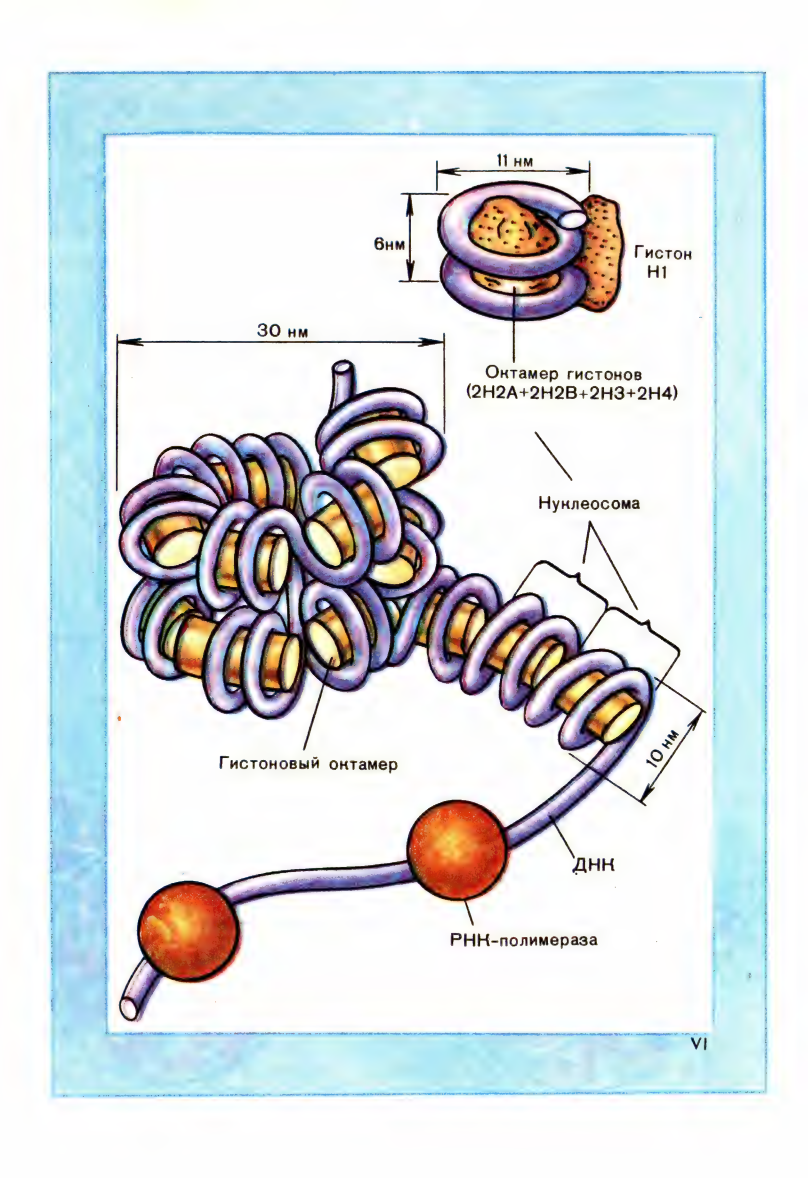


Рис. VI. Структура хроматина и строение нуклеосомы.

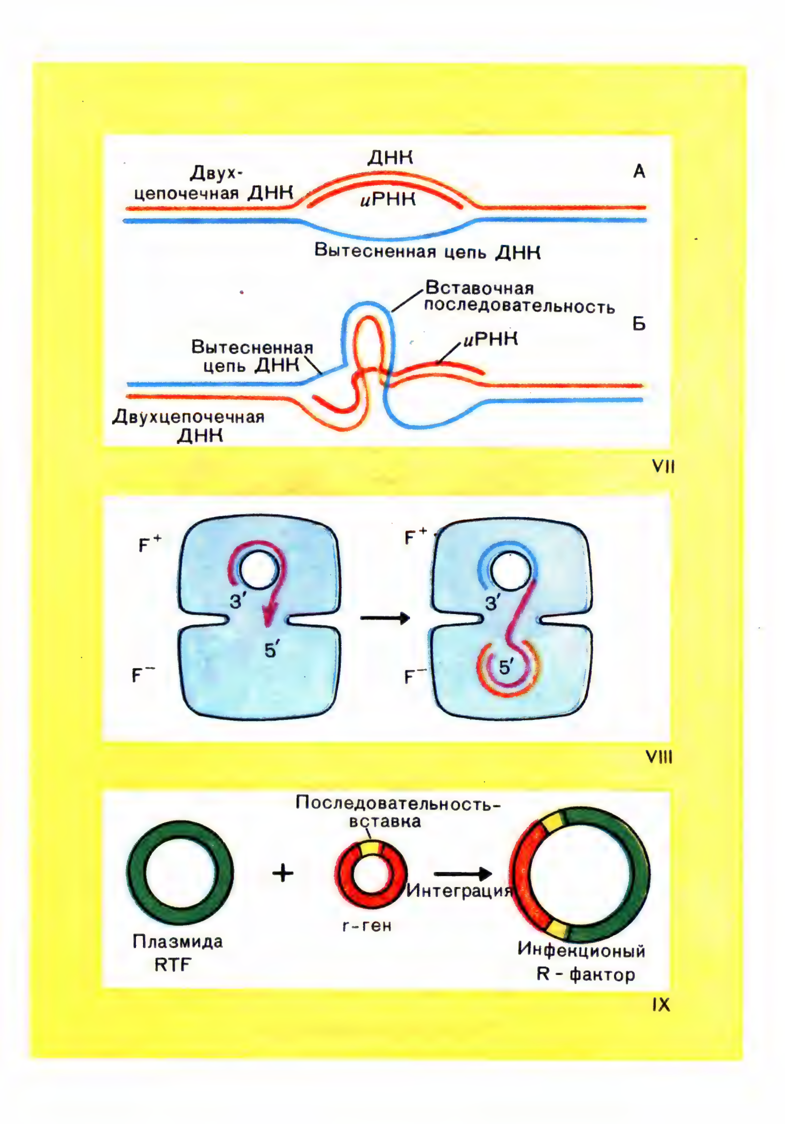


Рис. VII. Выявление вставочных последовательностей.

Рис. VIII. Механизм переноса нити фактора R при конъюгации.

Рис. IX. Образование фактора R.

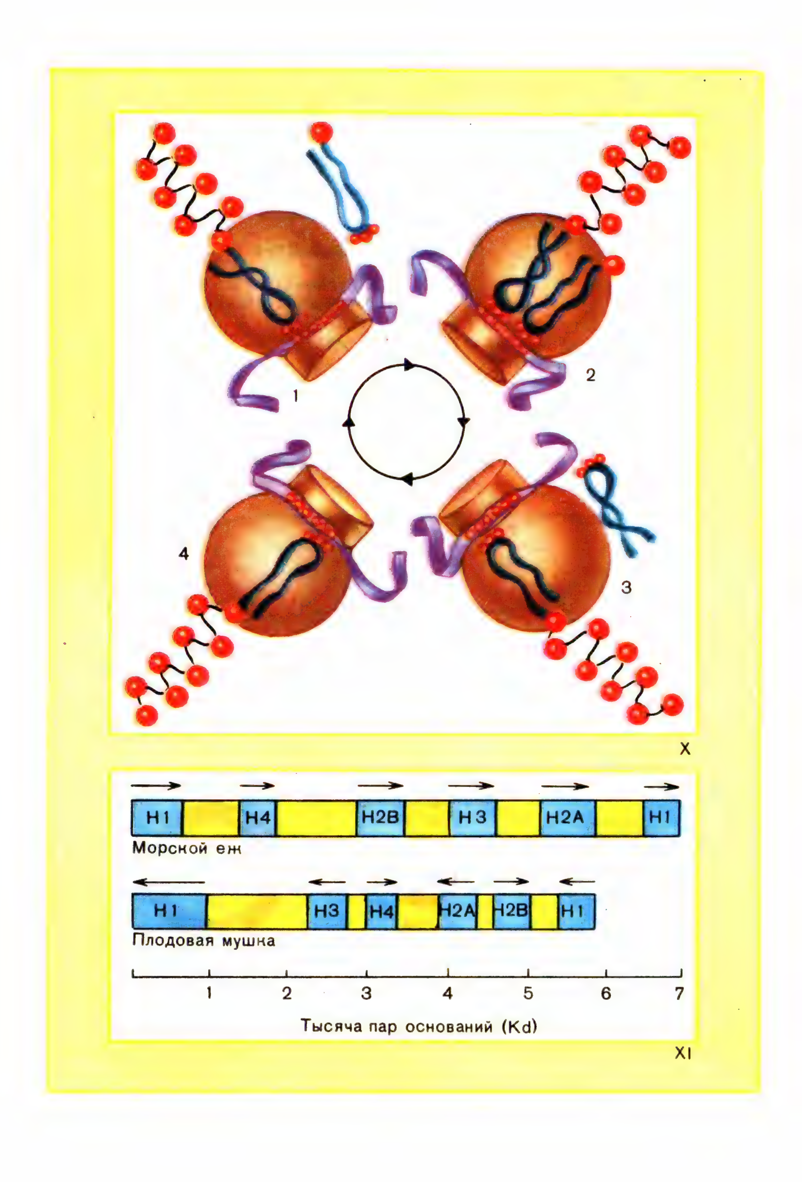


Рис. X. Сборка пептидов из аминокислот на рибосомах.

Рис. XI. Карта сгруппированных в кластеры гистоновых генов.

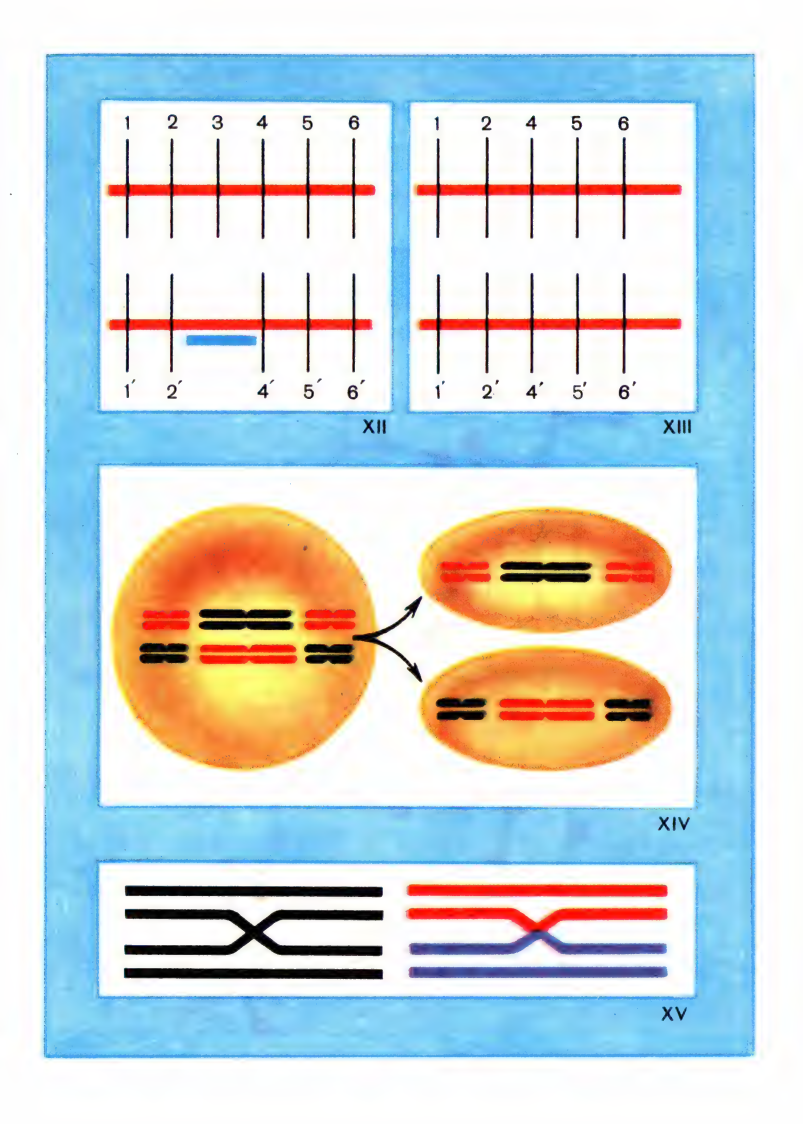


Рис. XII. Выпадение основания ДНК под действием акрифлавина.

Рис. XIII. Редуплицированная цепь ДНК. (Мутированный ген).

Рис. XIV. Схема мейоза. Перераспределение геномов.

Рис. XV. Схема кроссинговера. Образование хиазмы.

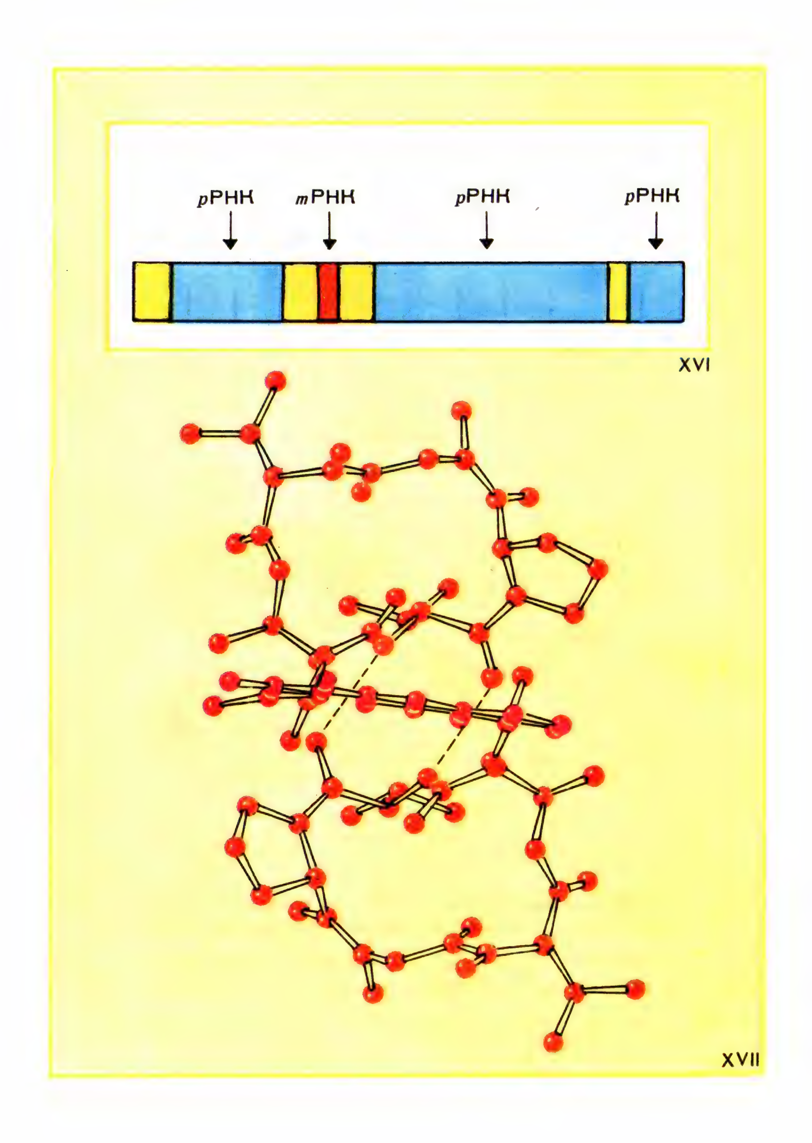


Рис. XVI. Образование молекул *p*РНК и одной молекулы *т*РНК.

Рис. XVII. Пространственная модель структуры актиномицина D.

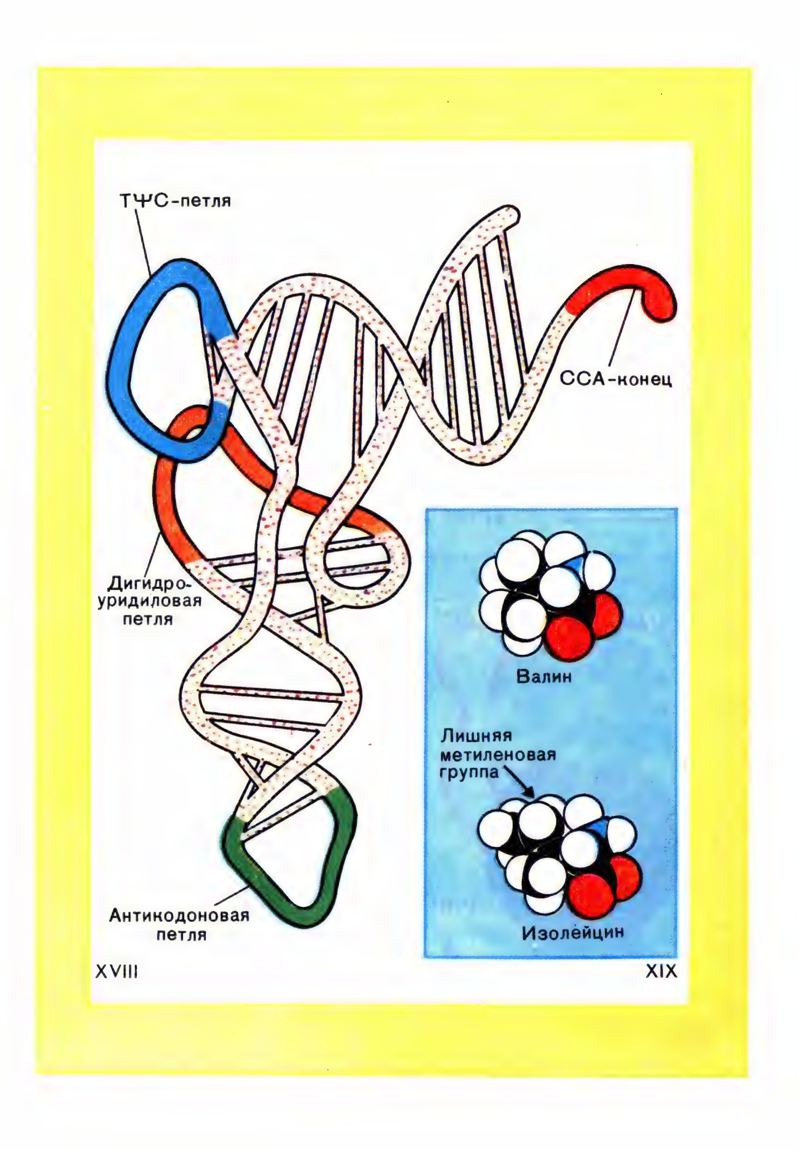


Рис. XVIII. Схема трехмерной структуры фенилаланиновой тРНК.

Рис. XIX. Пространственные модели валина и изолейцина.

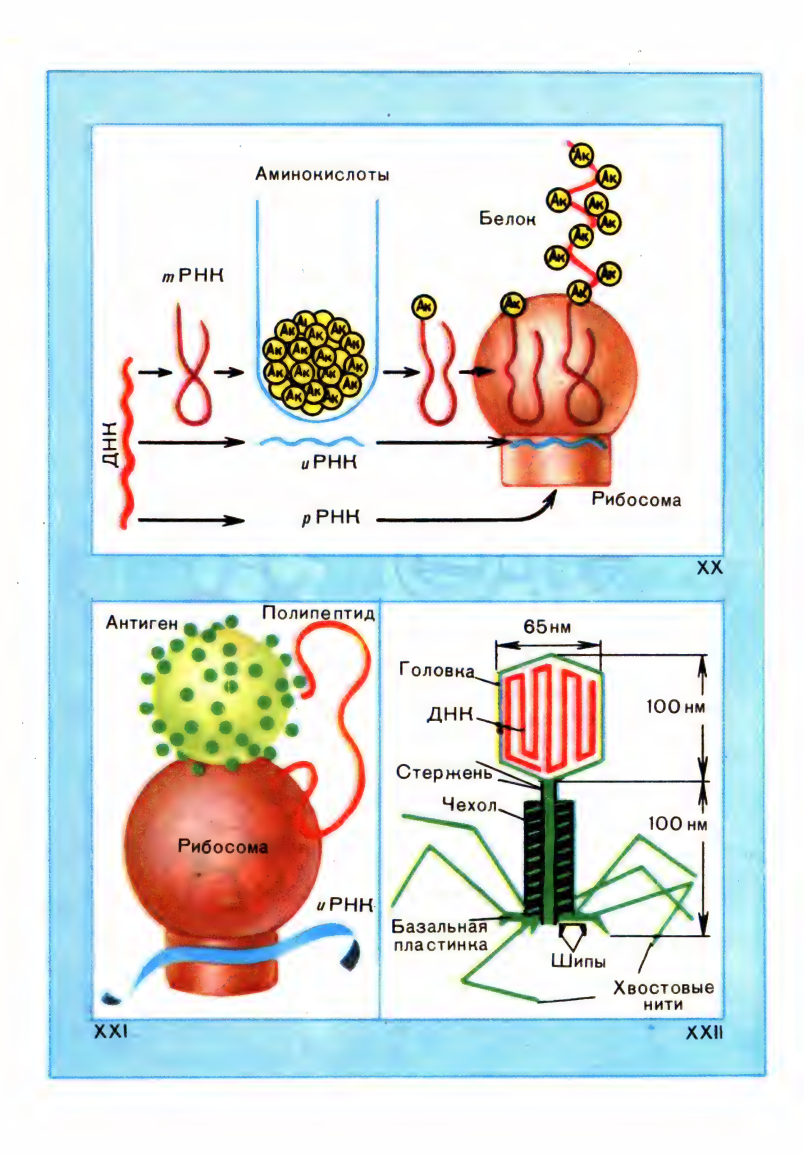


Рис. XX. Общая схема синтеза белка.

Рис. XXI. Гипотетическая схема образования антител.

Рис. XXII. Схема строения бактериофага Т2.

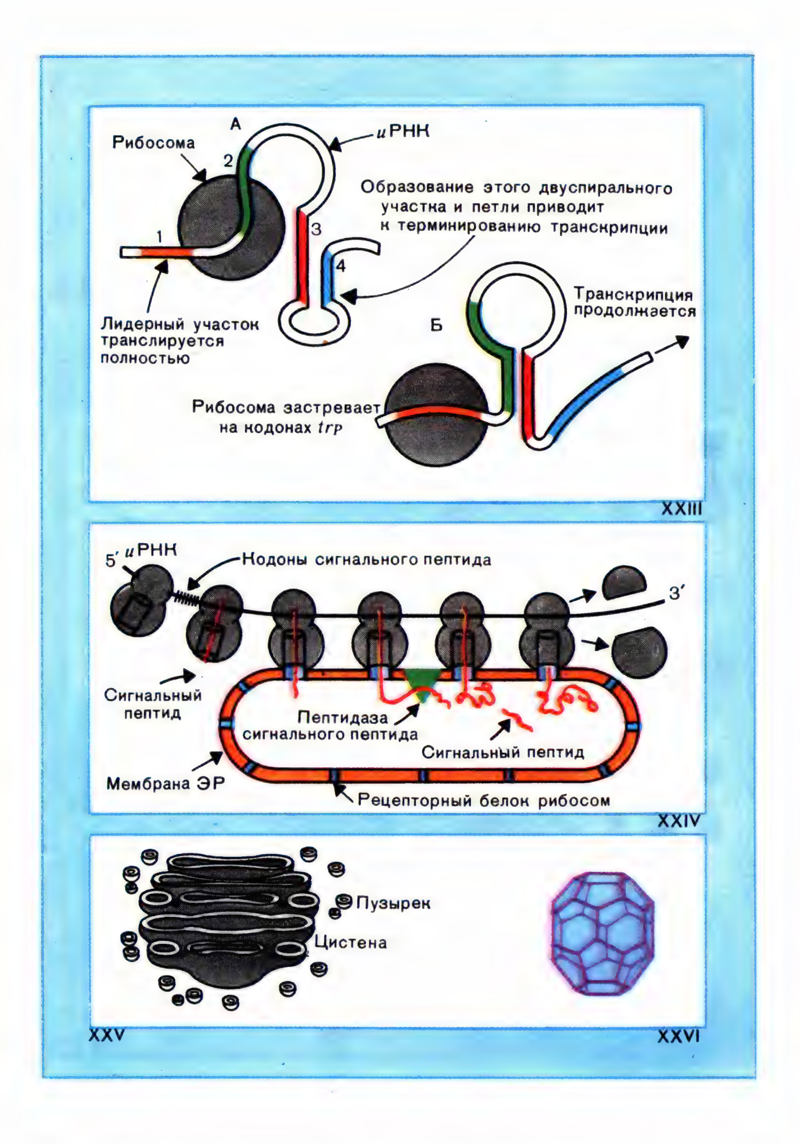


Рис. XXIII. Схема аттенюации триптофанового оперона кишечной палочки.

Рис. XXIV. Схема действия сигнальной последовательности белков.

Рис. XXV. Схематичное изображение аппарата Гольджи.

Рис. XXVI. Схематичное изображение окаймленного пузырька.

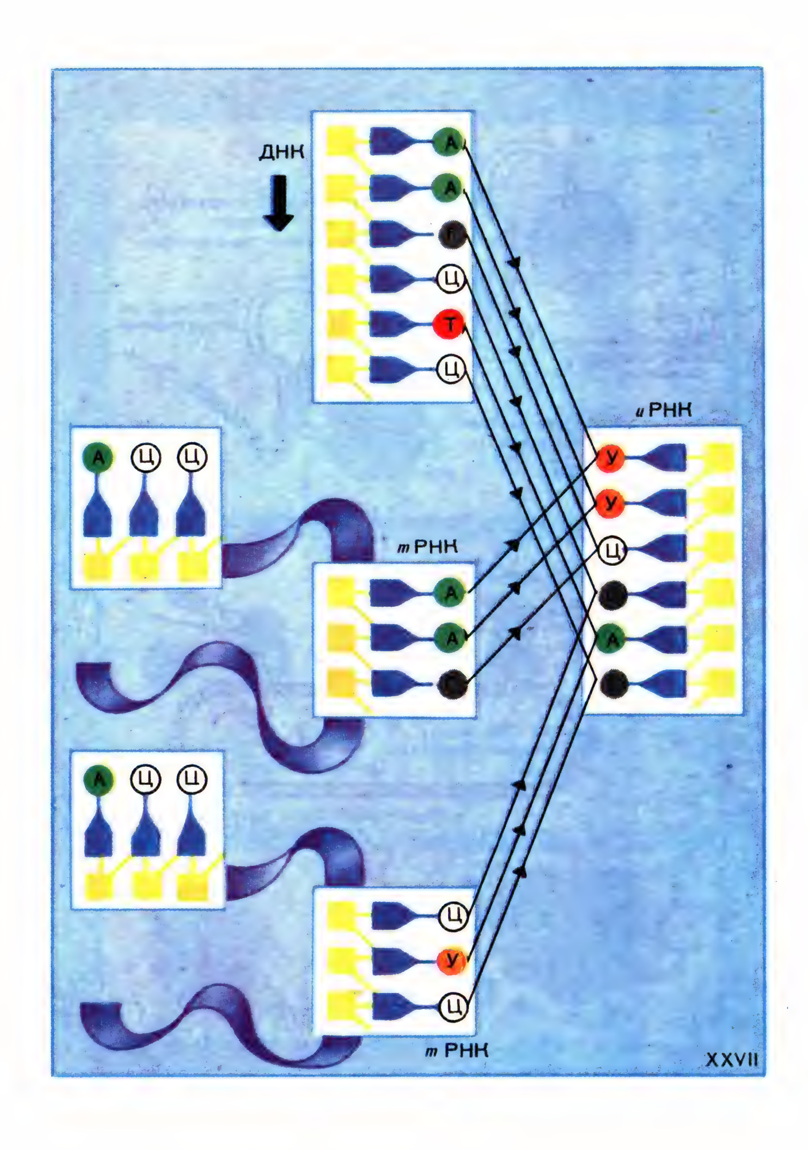


Рис. XXVII. Схема взаимоотношений кодогена, кодона и антикодона.

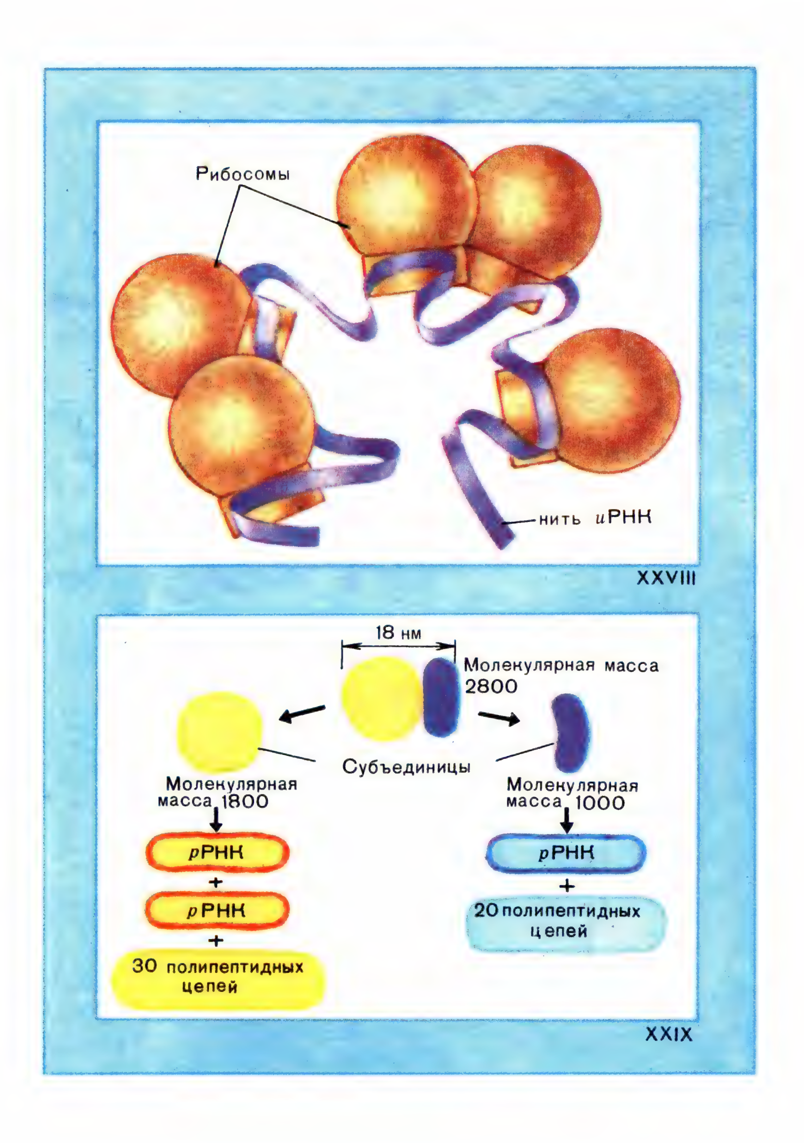


Рис. XXVIII. Полисома — комплекс молекулы *и*РНК и нескольких рибосом.

Рис. XXIX. Схема разделения рибосом на субъединицы.

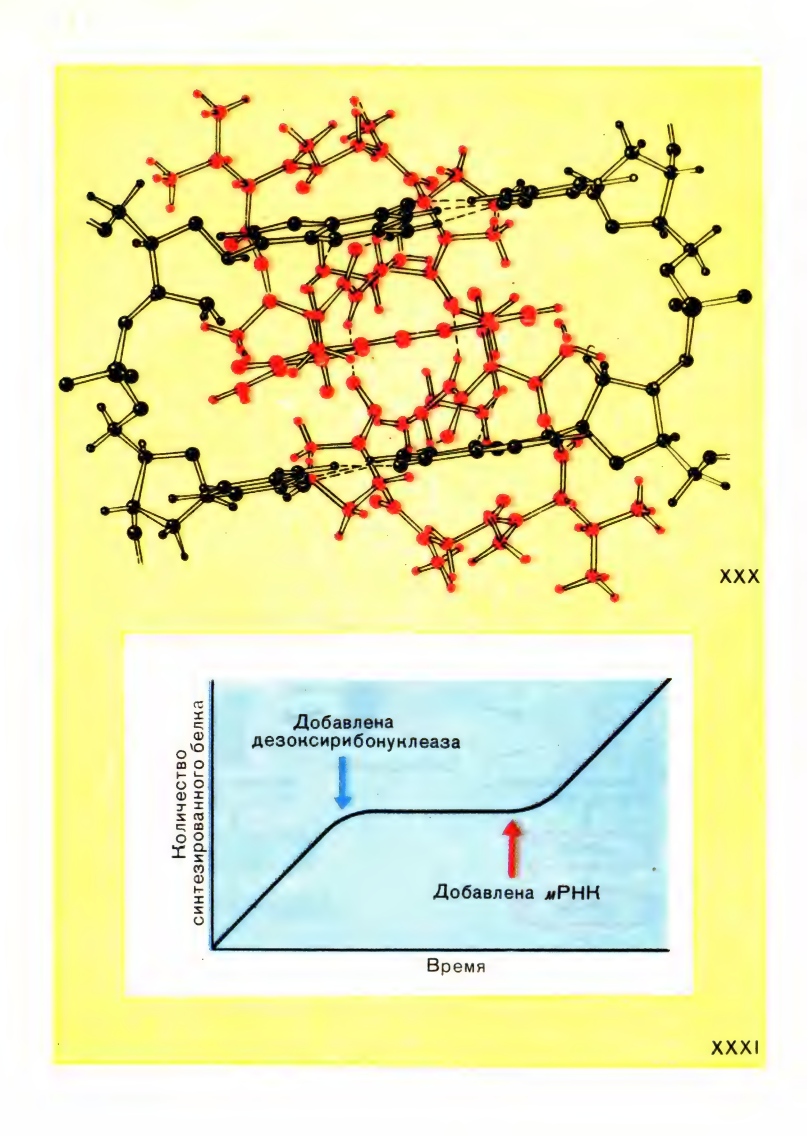


Рис. XXX. Структура комплекса актиномицина D с ДНК.

Рис. XXXI. Воздействие ДНК-азы и *и*РНК на образование белка.

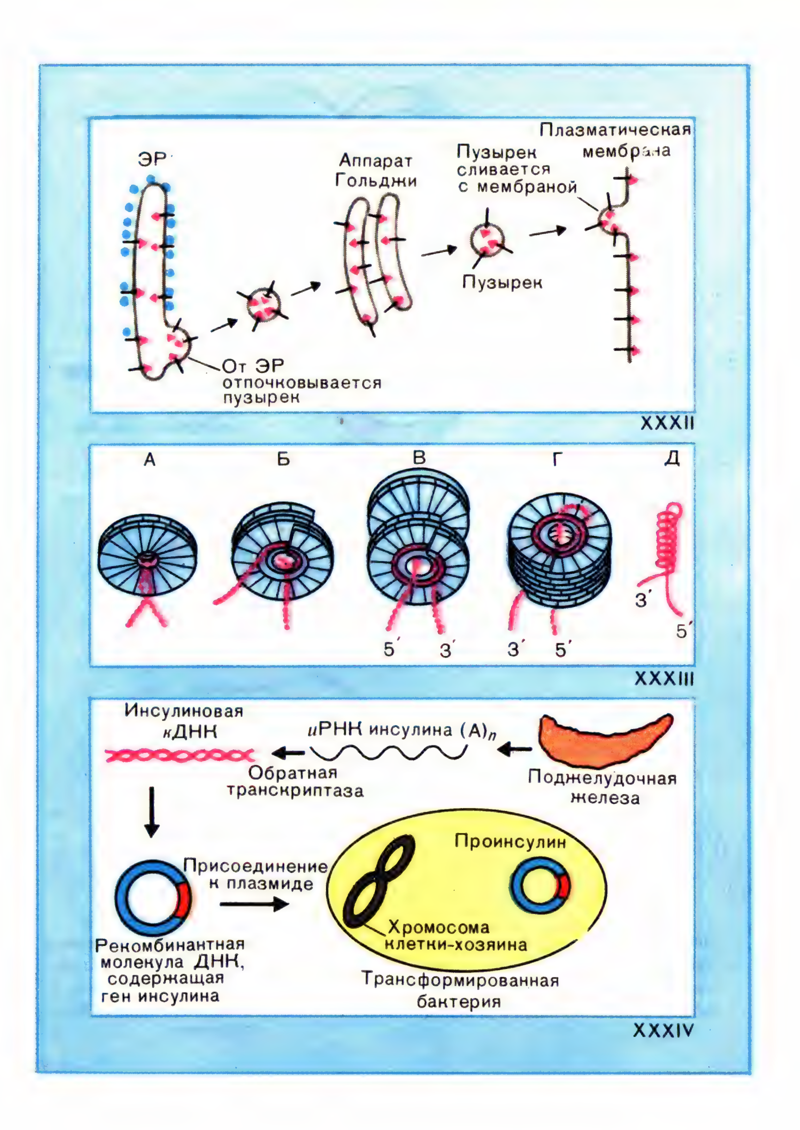


Рис. XXXII. Ассиметрия клеточных мембран.

Рис. XXXIII. Схема сборки вируса табачной мозаики.

Рис. XXXIV. Синтез предшественника инсулина — проинсулина.

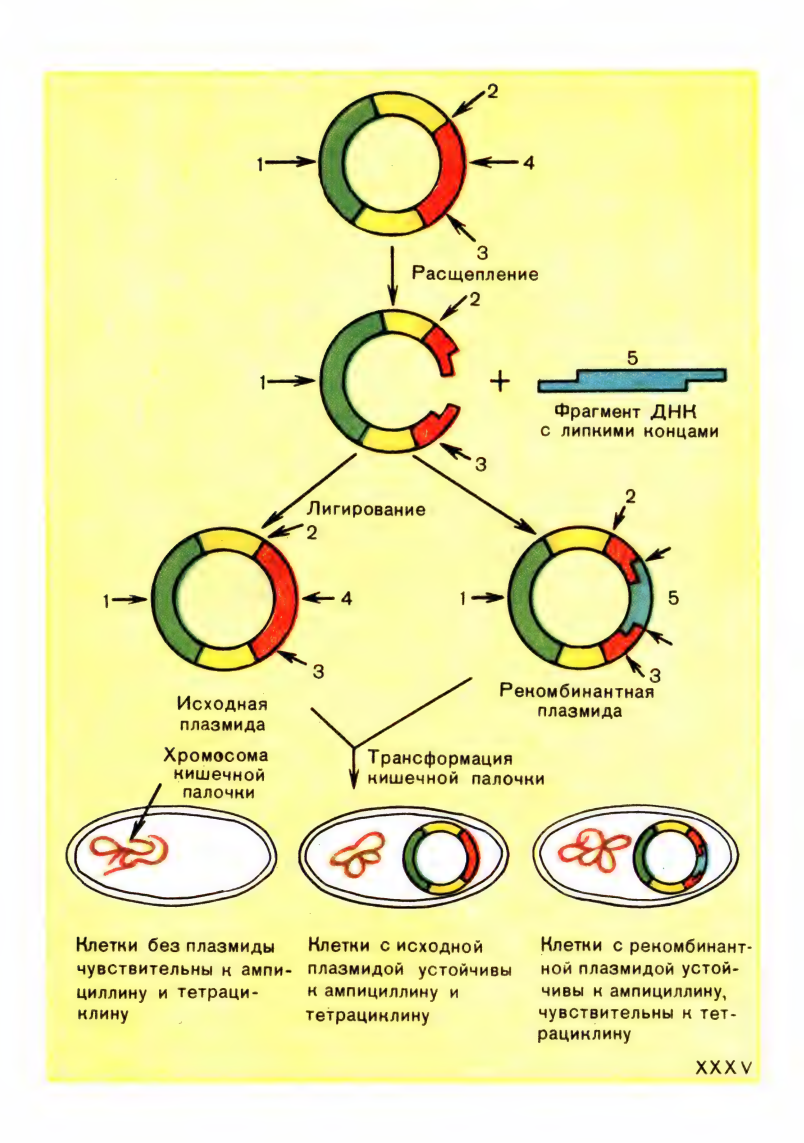


Рис. XXXV. Схема образования рекомбинантных плазмид.

ственную генетику. Генетика, как наука об изменчивости и наследственности организмов, использует методы молекулярной биологии в области теории и практики сельского хозяйства. Методы молекулярной биологии позволяют изучать основы жизненных явлений на уровне молекул, из которых состоят клетки, и в частности нуклеиновые кислоты.

Знания о нуклеиновых кислотах помогают понять и сущность многих заболеваний растений, в частности, вирусной этиологии, т. е. заболеваний, причиной которых является заражение растений вирусами. Это дает возможность эффективно применять соответствующие способы действенной профилактики и лечения таких заболеваний. Одним из наиболее ярких примеров является поражение листьев табака вирусом табачной мозаики.

Вирус табачной мозаики состоит из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки. Последняя включает 2130 отдельных молекул, объединенных в единый каркас. Наиболее вероятная модель формирования вирусной частицы показана на рисунке XXXIII. Сборка начинается с проникновения петли инициации в центральное отверстие двухслойного белкового диска. Петля связывается с первым оборотом диска, и прилегающий стебель, состоящий из спаренных оснований, раскрывается. Это взаимодействие переводит диск в спиральную форму. Диск захватывает РНК. Так начинается построение спирали вируса. Затем к новообразованной петле РНК, выступающей из центрального отверстия, присоединяется еще один диск. Благодаря протаскиванию 5′-конца через центральное отверстие растущей вирусной частицы при добавлении каждого следующего диска образуется новая петля. Наконец, происходит одевание 3′-конца и сборка вируса в клетке завершается.

Научный подход к проведению профилактических мероприятий, направленных на предотвращение развития вирусной инфекции и лечение вирусных болезней растений позволяет значительно сократить потери сельскохозяйственной продукции и в общем повысить производительность труда в сельском хозяйстве.

В животноводстве и ветеринарии используются все те же принципы и приемы, основанные на применении знаний о нуклеиновых кислотах, как и при расшифровке причин болезней человека, диагностике и лечении их.

Таким образом, знания о нуклеиновых кислотах имеют большое значение в сельском хозяйстве. Именно знание механизмов процессов, с которыми люди повседневно сталкиваются в своей работе в сельском хозяйстве, обеспечивает прогресс в этой области.

В последнее время появилось новое направление науки, которое даст возможность непосредственно вмешиваться в генетический аппарат клетки и эффективно на него влиять. Это направление называется генной инженерией. Оно делает возможным не только быстро создавать новые сорта растений и породы животных, но и в некотором роде заменять их.

Генная инженерия — это искусственное создание нового генетического аппарата клетки, имеющего нужные для человека свойства. Она включает систему методов, с помощью которых создаются рекомбинантные молекулы ДНК, представляющие собой искусственные генные структуры. Генная инженерия позволяет манипулировать генами, что дает возможность передавать генетическую информацию от одного организма другому, не родственному ему по генетическим свойствам. Генная инженерия по существу представляет собой разработку технологии рекомбинатных ДНК.

1972 год считается годом рождения генной инженерии. В этом году *П. Берг,* впоследствии удостоенный звания лауреата Нобелевской премии, вместе с сотрудниками в Стэнфордском университете (США) впервые получил гибридную молекулу ДНК.

В 1973 г. *Э. Чанг* и *С. Коэн* (Великобритания), а также *Х. Бойер* и *Р. Хеллинг* (США) впервые получили в пробирке биологически функциональные молекулы ДНК, содержащие генетическую информацию из двух разных источников.

Передача участка ДНК из одного генома микроорганизмов в другой с участием плазмид в качестве переносчиков состоит из расщепления ДНК и включения части ее в молекулу ДНК-носитель. Расщепление и включение генетического материала в ДНК осуществляется за счет применения рестриктаз и лигаз, ферментов, фрагментирующих и сшивающих нуклеиновые кислоты. Функция лигаз заключается в синтезе фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами. ДНК-лигаза не может соединить две молекулы одноцепочечной ДНК. Нити ДНК, соединяемые ДНК-лигазой, должны быть частью двухцепочечной молекулы

ДНК. Она образует связь только в том случае, если вблизи от места разрыва имеется хотя бы несколько пар оснований. Известно, что концы молекул ДНК у некоторых бактериальных вирусов могут соединяться путем образования пар оснований между комплементарными последовательностями нуклеотидов, которые находятся на концах одноцепочечных участков: аденин соединяется с тимином, а гуанин — с цитозином, и молекулы удерживаются вместе водородными связями, между парами нуклеотидов. Фермент концевая трансфераза катализирует присоединение ряда идентичных нуклеотидов специфически на 3′-концах одиночных цепей ДНК. Использование комплементарности соединений оснований и концевой трансферазы позволило соединить концы ДНК с помощью ДНК-лигазы (рис. 9).

Попав в организм-носитель, чужеродная молекула ДНК начинает реплицировать так же как и ДНК клетки-хозяина.

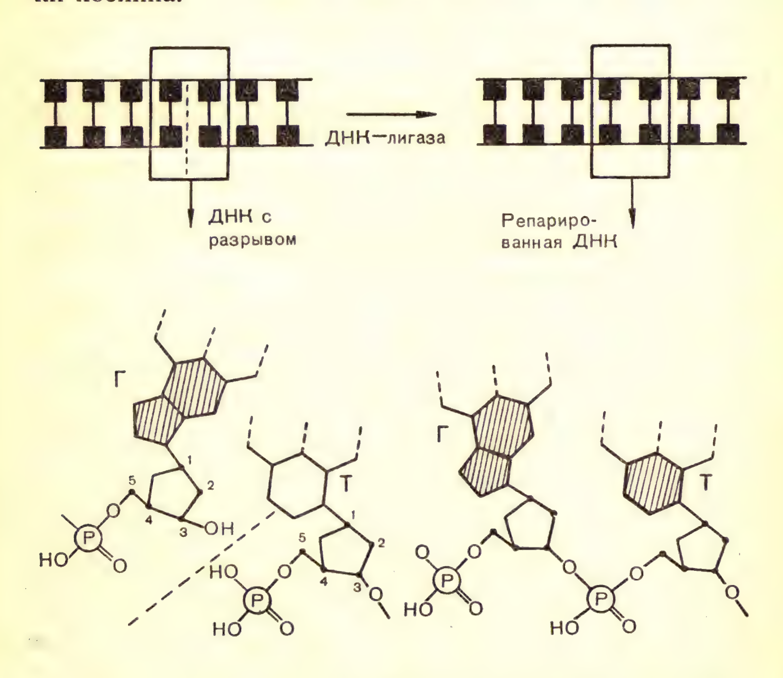


Рис. 9. Вверху показано, как ДНК-лигаза восстанавливает разрывы в одной из цепей двухцепочечной молекулы ДНК. ДНК-лигаза катализует синтез связи (внизу) между дезоксирибозой и фосфатом в месте разрыва (показано пунктиром).

Например, с помощью плазмид можно вводить фрагмент ДНК одного вида бактерий (золотистого стафилококка) в ДНК другого вида (кишечной палочки). После этого введения гены плазмид от неродственного вида бактерий (золотистого стафилококка) находятся в клетке кишечной палочки, где они проявляют биологические свойства исходного вида.

Проведены были также эсперименты с введением в кишечную палочку некоторых генов лягушки. Это означает, что ДНК прокариот можно комбинировать с ДНК эукариот.

Можно выделить четыре основных условия проведения генно-инженерных исследований:

1. Расщепление и соединение молекул ДНК, полученных из разных источников.

2. Наличие удобного носителя генов, который может реплицировать как себя самого, так и связанный с ним участок чужеродной ДНК.

3. Наличие удобного введения комбинированной молекулы ДНК в живую бактериальную клетку.

4. Наличие отбора из большой популяции клеток тех из них, в которых прижилась комбинированная молекула ДНК.

С помощью генной инженерии, позволяющей нарабатывать в бактериальной клетке индивидуальные фрагменты любой чужеродной ДНК, в частности ДНК из животных клеток, можно выделить, накопить и исследовать индивидуальные гены.

Технология рекомбинантных молекул ДНК позволяет выделять сегменты ДНК и воспроизводить их в бактериях. Это дает возможность получить требуемые сегменты ДНК в количествах, достаточных для детального их изучения и практического использования. Такой подход дает возможность встраивать ДНК и добиваться синтеза белка, кодируемого данной ДНК в промышленных количествах.

С помощью методов генной инженерии синтезирован ген, кодирующий *лимфотоксин* — белок, убивающий опухолевые клетки. Лимфотоксин убивает только опухолевые клетки и при этом не оказывает вредного воздействия на нормальные клетки. Для промышленного производства лимфотоксина кодирующий его ген вводят в бактериальную клетку кишечной палочки. Скорость продуцирования клеткой кишечной палочки в 500 раз выше, чем культурой лимфоцитов.

Результаты генной инженерии нашли также практическое применение в производстве *интерферона.* В результате клинических исследований установлено, что интерферон человека обладает выраженным противовирусным и антипролиферативным действием. *Антипролиферативное действие* интерферонов заключается в том, что они тормозят размножение опухолевых клеток. До недавнего времени клинические испытания действия интерферона проводились с использованием человеческого интерферона, выделенного из лейкоцитов. Однако широкое клиническое применение интерферона резко затормозились в связи с дефицитом лейкоцитов донорской человеческой крови. Промышленное производство интерферона в больших количествах, способных удовлетворить спрос на него, стало возможным только благодаря успехам генной инженерии.

Генно-инженерные интерфероны с успехом применяются для лечения гепатита, парагриппозной инфекции, некоторых видов злокачественных опухолей. Интересно отметить, что использование интерферона сопровождается побочным явлением — увеличением длины ресниц у принимавших этот препарат.

Возможность встраивания участка ДНК млекопитающих в ДНК бактерии кишечной палочки была использована для промышленного синтеза гормона поджелудочной железы инсулина. Инсулин применяется в медицине для лечения сахарного диабета, заболевания, характеризующегося недостаточным содержанием инсулина в организме больных. Раньше инсулин, применявшийся для медицинских целей, получали из поджелудочной железы животных. Сейчас источником получения инсулина является кишечная палочка. Отправной точкой этого исследования явилась инсулинома — опухоль поджелудочной железы, выделяющая большое количество инсулина (рис. XXXIV). Эта опухоль богата молекулами *и*РНК для синтеза предшественника активного гормона препроинсулина. С помощью обратной транскриптазы этой *и*РНК была получена двухцепочечная комплементарная ДНК, которую затем включили в состав плазмиды, используемой для переноса ДНК в клетки кишечной палочки. Действительно, несколько бактериальных клонов, трансформированных инсулиновой комплементарной ДНК, синтезируют предшественник инсулина: около 100 копий на клетку. Почему именно комплементарную ДНК, а не геномную ДНК вводят в клетки кишечной

палочки? Как уже отмечалось, многие эукариотические гены содержат вставочные последовательности нуклеотидов, которые вырезаются из первичных транскриптов. Поскольку бактерии не способны удалять эти последовательности, необходимо трансформировать их участком ДНК, комплементарным зрелой *и*РНК.

Еще одним примером практического применения генной инженерии является химически синтезированный ген пептидного гормона соматостатина, выраженный также в клетках кишечной палочки. Недавно была получена последовательность молекулы ДНК, кодирующей овальбумин куриного яйца, которую экспрессировали в клетках кишечной палочки.

В настоящее время еще сохраняется большая потребность в недорогих и безопасных вакцинах, которые представляют собой по сути дела белок. Именно с помощью генной инженерии инфекционные агенты, способные использовать в качестве носителей молекулы ДНК, кодирующей другие антигены, можно так изменить, чтобы свести к минимуму случаи осложнений. Вакцинация необходима для профилактики многих заболеваний. Применение генной инженерии при разработке вакцин является перспективным, так как дает возможность бороться со многими еще распространенными сейчас инфекциями, в частности с малярией, которой страдает пока значительная часть населения Латинской Америки.

Использование таких вакцин в борьбе с оспой при массовой вакцинации населения в развивающихся странах дало огромный успех. Частота развития осложнений при вакцинации не превышала 1 человека на 300 000 вакцинированных, что гораздо меньше, чем при использовании обычных вакцин. Потенциальная выгода, которую дает такой подход в вакцинации, несоизмеримо больше по сравнению с отмеченным недостатком и гораздо выше, чем при вакцинации обычными вакцинами. Тем не менее, совершенствуя препарат, ученые работают над повышением его безопасности, чтобы свести на нет риск возникновения осложнений.

Используются генно-инженерные вакцины и в ветеринарии. Например, в бактерии кишечной палочки была внесена молекула ДНК, кодирующая белок вируса ящура, — болезни, поражающей крупный рогатый скот и приносящей огромные убытки животноводам. Вирус ящура в неактивной форме, т. е. в состоянии понижен-



ной жизнеспособности, является сейчас основой для производства используемых в ветеринарии вакцин. Однако вакцинация вирусами с пониженной активностью часто сопровождается развитием различных осложнений, например развитием инфекционного заболевания в тяжелой форме.

Сегменты ДНК, введенные в бактерию кишечной палочки, стали в огромных количествах продуцировать белок вируса ящура, который используют для иммунизации животных. С применением такого белка удалось защитить крупный рогатый скот от заболевания ящуром.

Использование этого препарата вместо вакцины имеет много преимуществ. В нем не содержатся вирусные частицы, которые способны вызвать инфекцию, он практически безвреден.

Сейчас существует возможность внесения участков ДНК, кодирующих несколько различных антигенов, в бактериальный геном с последующим проявлением действия внесенного участка ДНК. Получены штаммы некоторых бактерий, которые при приеме их в виде микстуры или капсул могут размножаться в кишечнике и образовывать колонии. Если ввести в такие бактерии молекулы ДНК, кодирующие чужеродные антигены, то такой подход будет чрезвычайно перспективен в борьбе с кишечными инфекциями типа холеры. Огромное преимущество использования вирусов и бактерий для

таких целей заключается в возможности однократного их применения. Затем они будут самостоятельно размножаться в кишечнике больного до полного его выздоровления. Благодаря применению таких препаратов можно будет путем одноразового введения вакцины обеспечить длительный иммунитет. Кроме того, эти препараты отличаются высокой стабильностью и стоимость их производства невелика.

В перечень методов генной инженерии входят ускорение и улучшение селекции производительных промышленных штаммов-продуцентов антибиотиков, витаминов, аминокислот, нуклеотидов и нуклеозидов, ферментов. Генная инженерия является одной из составных частей современной генетики промышленных микроорганизмов, которые продуцируют различные органические вещества, имеющие значение для заводов и фабрик. С помощью генной инженерии создаются клоны бактерий, которые синтезируют нужные вещества в больших (промышленных) количествах препараты.

Как и в любой другой науке, в генной инженерии существуют два аспекта: теоретический и практический. Теория нуклеиновых кислот позволила на практике управлять генным аппаратом на уровне молекул, можно осуществлять управление генным аппаратом на уровне клеток, организма и популяции в целом. Человек приобретает могущественный способ воздействия на природу, по своим социально-экономическим последствиям сравнимый с последствиями приручения силы атомной энергии.

Генная инженерия — это новое направление науки, имеющее приложение как в медицине, так и в сельском хозяйстве. С развитием этого направления коренным образом изменилась возможность проникновения вглубь биологических, и в частности генетических, явлений. Открытие перспектив управления наследственным материалом, манипулирования генетическими молекулами явилось важнейшим следствием, а теперь уже и целью изучения строения и функционирования нуклеиновых кислот. Это открытие привело к тому, что биология, вслед за химией и физикой, оказалась включенной в научно-технический прогресс. Достижения генной инженерии используются в новой отрасли промышленности — биотехнологии.

В перспективе возможно создание организмов с совершенно новыми генетическими качествами, ранее не



встречавшимися на Земле и эволюционно не обусловленными.

В этом таится и опасность генной инженерии, так как последствия такого рода экспериментов предсказать чрезвычайно трудно. Поэтому развитие ряда сфер генной инженерии временно даже приостановлено. Например, в свое время намечались эксперименты по введению специфических раковых вирусов, вызывающих опухоли у мышей и хомяков, в бактериальные клетки кишечной палочки.

Кишечная палочка постоянно обитает в кишечнике человека в нормальных условиях. В естественном виде и этот вирус, и бактерии безвредны для человека. Однако вызывает беспокойство то, что с течением времени гибридная бактерия может оказаться за пределами экспериментальной среды и внести раковый вирус в живую клетку человека. Поэтому П. Берг, в лаборатории которого должны были проводиться эти эксперименты, решил временно отказаться от них.

Какие же существуют перспективы применения генной инженерии? Они, по-видимому, будут заключаться в улучшении традиционных микробиологических процессов получения сложных соединений, интенсификации этих процессов, а также создании принципиально новых микробиологических процессов получения необходимых соединений.

Таким образом, генная инженерия открывает широкие перспективы изменения наследственных свойств

различных организмов: бактерий, вирусов, растений, животных. Эти организмы приобретают свойства, которые можно эффективно использовать в медицине, сельском хозяйстве и других сферах народного хозяйства.

Однако достижения генной инженерии следует использовать разумно, не нарушая экологического равновесия в природе. Произвольное изменение генетического материала способно так нарушить взаимоотношения видов животных, растений, микроорганизмов, что последствия этого вмешательства станут катастрофой для человечества. Чтобы избежать неблагоприятных последствий прогресса в области генной инженерии, важно не только изучение нуклеиновых кислот, но и этико-нравственная оценка последствий использования этих знаний.

В настоящее время внимание общественности многих стран обращено к экологическим проблемам, связанным с интенсивным воздействием производственных факторов на живые системы. Необходимость изучения нуклеиновых кислот диктуется не только их научно-практическим значением, но и желанием каждого гражданина, небезразличного к проблемам экологии, знать причины возникновения этих проблем.

Заключение

Итак, нуклеиновые кислоты — это биополимеры, находящиеся во всех клетках живых организмов и отвечающие за хранение, передачу и реализацию наследственной информации. Прочитав книгу, вы теперь знаете ответы на два наиболее важных вопроса биологии: каким образом клетка хранит генетическую информацию и как эта информация руководит работой всей клетки? С тех пор как 40 лет назад было установлено, что хранителем генетической информации является молекула нуклеиновой кислоты, в частности ДНК, знания о нуклеиновых кислотах значительно расширились и углубились. Было установлено, что информация, содержащаяся в ДНК, передается, или транскрибируется, на молекулу другой нуклеиновой кислоты — *и*РНК, которая затем перемещается через ядерную мембрану и выходит из ядра клетки в цитоплазму, перенося таким образом генетическую информацию. На основе *и*РНК происходит синтез молекул белка, выполняющих самые разнообразные функции.

Знания о нуклеиновых кислотах используются в нескольких основных направлениях.

Во-первых, они позволяют понять механизм явлений, с которыми человек имеет дело.

Во-вторых, изучение физико-химических свойств и механизма функционирования молекул ДНК и РНК дает возможность прогнозировать вероятность возникновения и предполагаемое развитие наследственных болезней. Это является основой медико-социального консультирования, направленного на профилактику наследственных болезней.

В-третьих, изучение содержания нуклеиновых кислот позволяет использовать такие методы для диагностики.

В-четвертых, препарат нуклеиновых кислот используется для лечения заболеваний.

В-пятых, что является, по-видимому, самым важным сейчас направлением — это генная инженерия и биотехнология. Революция в подходе к использованию нуклеиновых кислот в промышленности дала принципиально новые технологические процессы выпуска продукции в рамках новой отрасли — биотехнологии.

Генная инженерия позволит эффективно бороться с различными заболеваниями человека. Возможно, с ее помощью удастся создать принципиально новые, не существовавшие в природе растительные и животные организмы, обладающие нужными для человека свойствами. Уже сейчас с помощью генной инженерии созданы штаммы микроорганизмов, продуцирующих те или иные необходимые для практического использования вещества. Применение микроорганизмов с заданными генетическими свойствами позволяет получать вещества высокой степени чистоты. Ни один существующий химический технологический процесс не может воспроизвести подобный синтез с такой чистотой, производительностью и низкой стоимостью расходов на создание и эксплуатацию, как промышленная линия микробного синтеза.

Возможности, которые открывает генная инженерия перед человечеством как в области фундаментальной науки, так и во многих других областях, и в частности в практическом приложении, поистине безграничны. Однако в применении этих возможностей нужны разумная осторожность и научное обоснование в прогнозах, особый учет тех опасностей и ошибок, которые могут при этом встретиться. Все это реально выполнимо только на основе знаний о нуклеиновых кислотах.

Оценивая перспективы использования знаний о нуклеиновых кислотах, можно с уверенностью сказать, что многие выдающиеся достижения, открытия будут сделаны именно с использованием этих знаний. Понимание и реализация наследственной информации, которая содержится в нуклеиновых кислотах, позволит, возможно, навсегда избавиться от многих сейчас еще считающихся неизлечимыми наследственных заболеваний.

Обобщая изложенный материал, следует выделить несколько особо важных моментов, имеющих значение для понимания природы и свойств нуклеиновых кислот. Напомним, что *ДНК* является носителем наследственной информации как в прокариотических клетках, так и в клетках эукариотов. Исключение составляют вирусы, у которых в качестве генетического материала может выступать либо ДНК, либо РНК. ДНК в клетке представлена двумя длинными спирально закрученными полинуклеотидными цепочками. Эти цепи параллельны друг другу. Азотистые основания полинуклеотидных цепей расположены внутри спирали, а сахарофосфатный остов — снаружи. Параллельная конформация двух полинуклеотидных цепочек обусловлена тем, что между азотистыми основаниями устанавливаются водородные связи, каждая между парой оснований. Существует закономерность, которая заключается в том, что аденин всегда соединяется с тимином, а гуанин — с цитозином. Отсюда следует, что цепи двойной спирали взаимно комплементарны, т. е. дополняют друг друга. Генетическая информация в ДНК закодирована в виде последовательности нуклеотидов. В большинстве случаев ДНК представлена в виде линейной формы, но может иметь и кольцевую форму. Кольцевая ДНК может закручиваться с образованием суперспирали, что делает ДНК более компактной. При репликации ДНК две ее нити расходятся и на каждой из них синтезируется новая нить ДНК. Каждая исходная цепь является матрицей для синтеза новой полинуклеотидной последовательности. Следовательно передача наследственности осуществляется полуконсервативным способом, т. е. в каждую дочернюю пару цепей ДНК попадает по одной исходной и по одной вновь синтезированной цепочке. Репликация ДНК осуществляется при участии многих ферментов: ДНК-полимераз и ДНК-лигазы. Новая ДНК синтезируется из активированных предшественников: четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Присоединение к гидроксильному концу цепи ДНК нового нуклеотида ДНК-полимеразой осуществляется лишь в том случае, если основание нуклеотида комплементарно основанию родительской цепи. Следовательно функционирование ДНК-полимеразы определяется родительской ДНК. ДНК-полимеразы могут также обладать и нуклеазной активностью, удаляя некомплементарные нуклеотиды и повышая таким образом надежность

репликации, а также принимая участие в механизмах репарации ДНК.

Репликация ДНК начинается в строго определенном месте и идет одновременно в двух направлениях. Расплетение родительской ДНК осуществляется за счет энергии гидролиза АТФ и при участии специфического фермента. В процессе синтеза ДНК происходит встраивание в ее структуру молекулы РНК. Впоследствии эти участки РНК гидролизуются и замещаются ДНК. Концы фрагментированной ДНК соединяются с помощью фермента ДНК-лигазы.

Передача генетической информации в клетке осуществляется только в направлении от ДНК к РНК, от РНК к белку. Существуют три типа молекул *РНК* в клетке: *и*РНК, *т*РНК и *р*РНК. Все молекулы РНК одноцепочечные за исключением отдельных участков *т*РНК и *р*РНК, которые в некоторых местах сближаются друг с другом, образуя спиральные фрагменты. Протяженность РНК сильно варьирует от 75 нуклеотидов для *т*РНК до более 5000 нуклеотидов для *и*РНК. Молекулы РНК синтезируются в соответствии с исходной матрицей, которой является ДНК, при участии фермента РНК-полимеразы. В отличие от ДНК-полимеразы для функционирования РНК-полимеразы не требуется наличия затравки. Существенное отличие синтеза РНК от синтеза ДНК заключается в том, что если при синтезе ДНК исходная ДНК-матрица разрушается, то при синтезе РНК исходная ДНК-матрица не разрушается и может использоваться многократно. Синтез РНК начинается со связывания РНК-полимеразы с участками ДНК-матрицы, что приводит к ее локальному расплетению ДНК. Расплетение ДНК-матрицы создает благоприятные условия для формирования первой фосфодиэфирной связи. Окончание транскрипции РНК на матрице ДНК осуществляется за счет наличия в составе ДНК стоп-сигналов. Некоторые вещества могут специфически ингибировать транскрипцию, подавляя таким образом передачу генетической информации в клетке и вызывая ее гибель. Среди широкого спектра таких веществ можно выделить полусинтетический антибиотик рифампицин, который ингибирует инициацию синтеза РНК, а также актиномицин D, блокирующий синтез РНК.

Последовательность аминокислотных остатков в *белке* соответствует последовательности нуклеотидов в

ДНК. Это соответствие определяет понятие генетического кода, т. е. взаимосвязи последовательности оснований в ДНК и последовательности аминокислотных остатков в белке. Каждая аминокислота кодируется в ДНК группой из трех оснований. Из 64 таких триплетов 61 кодирует определенную аминокислоту, а оставшиеся три триплета УАА, УАГ и УГА служат сигналами терминации. Таким образом, в отношении кодирования аминокислот существует некоторая избыточность количества кодонов над количеством аминокислот. Одну и ту же аминокислоту кодируют несколько кодонов, причем отличие между ними заключается только в последнем основании кодона. Генетический код универсален и найден у всех живых организмов и клеток. Генетический код был расшифрован в результате серии экспериментов, во время которых производили замену или исключали одно из звеньев реализации передачи генетической информации от ДНК к белку.

Характерной особенностью многих генов эукариот является фрагментарность их строения, заключающаяся в том, что между экзонами (кодирующими последовательностями) расположены интроны. Интроны удаляются во время процессинга первичных транскриптов РНК, и зрелая *и*РНК уже не содержит интронных последовательностей нуклеотидов. Поэтому последовательность аминокислот в белке полностью соответствует последовательности оснований в экзонах гена.

Мутации — изменения в передаче наследственной информации, образующиеся в последовательности нуклеотидов в ДНК. Наиболее распространенным типом мутаций в ДНК является замена одной пары азотистых оснований на другую. Мутации могут возникать либо спонтанно, например при таутомеризации, либо под действием некоторых химических веществ. Определение мутагенной активности, которое довольно просто можно выполнить на бактериях, используют для оценки канцерогенной активности новых веществ, синтезируемых для производственных и бытовых целей.

Трансляция представляет собой сложный процесс, в который вовлечены более 100 макромолекул, координированное взаимодействие которых необходимо для правильного синтеза белка. Трансляция начинается с того, что активирующие ферменты аминоацил-*т*РНК-синтетазы, используя энергию АТФ, активируют аминокислоты. Для каждой аминокислоты существуют хотя бы в единствен-

ном экземпляре специфическая *т*РНК и специфическая аминоацил-*т*РНК-синтетаза. Все *т*РНК отличаются тем, что имеют одинаковое строение (напоминают клеверный листок), примерно одинаковое количество нуклеотидов и содержат в своем составе модифицированные азотистые основания, например, метилированные. Синтез белка на *и*РНК осуществляется за счет того, что *и*РНК узнает антикодон *т*РНК, которая транспортирует специфическую для нее аминокислоту. Кодон *и*РНК комплементарен антикодону *т*РНК. Однако некоторые *т*РНК присоединяются не только к комплементарным кодонам. Синтез белка осуществляется в рибосомах, состоящих из большой и малой субъединиц. Каждая из субъединиц примерно на две третьих по массе состоит из РНК, а на одну треть — из белка. Синтез белка на рибосомах осуществляется в три этапа. Сигналом начала трансляции *и*РНК служат кодоны АУГ или ГУГ, которым предшествует последовательность нуклеотидов с преимущественным содержанием пуриновых оснований. Продолжение синтеза белка включает последовательное присоединение аминоацил-*т*РНК и образование пептидной связи между аминокислотами, что лежит в основе формирования всех последующих структур белка. Синтез белка заканчивается на терминирующих кодонах УАА, УГА или УАГ. Окончание синтеза молекулы белка осуществляется за счет гидролиза связи между полипептидной цепью и молекулой *т*РНК. Различные антибиотики и некоторые химические вещества могут избирательно ингибировать те или иные стадии синтеза белка. Эта особенность используется для изучения механизма синтеза белка, а также для подавления роста бактерий в лечебных целях.

Регуляция количества синтезируемых в клетке белков осуществляется разными способами. У бактерий экспрессия генов регулируется на уровне транскрипции. Гены бактерий организованы в опероны, которые состоят из регуляторных участков и структурных генов. Кроме того в составе ДНК вне оперона существует еще так называемый регуляторный ген. Регуляция может осуществляться и синтезируемым продуктом по типу обратной связи. Так, например, триптофан связывается со специфическим репрессором. Связывание этого специфического репрессора с оператором триптофанового оперона приводит к тому, что транскрипция

ответственных за биосинтез триптофана генов оператора прекращается. Контролируют функционирование некоторых оперонов синтеза аминокислот также и аттенюаторы. В некоторых случаях регуляция генов осуществляется за счет циклического аденозинмонофосфата, который в комплексе с белком взаимодействует с промотором оперона и инициирует транскрипцию. Сама по себе концентрация циклического аденозинмонофосфата связана с концентрацией в окружающей среде глюкозы. Концентрация циклического аденозинмонофосфата увеличивается при недостатке глюкозы. Следовательно, повышение концентрации глюкозы тормозит синтез некоторых ферментов опосредованно через циклический аденозинмонофосфат.

В клетках эукариот каждая хромосома содержит одну молекулу двуспиральной ДНК. Длина молекулы ДНК эукариот примерно в 100 раз превосходит длину молекулы ДНК прокариот.

ДНК в ядре клеток находится не в свободном состоянии, она связана с белками, называемыми гистонами. Хроматиновая нить ядра клетки представляет собой последовательность нуклеосом. Нуклеосома — фрагмент ДНК, который как бы накручен на гистоновый остов, состоящий из двух молекул белка. Структурная компановка ДНК в виде нуклеосом позволяет уменьшить длину ДНК в семь раз. При делении клетки репликация ДНК эукариот начинается сразу в нескольких тысячах мест одновременно. Отличием эукариотической ДНК от прокариотической ДНК является большое число повторов последовательностей нуклеотидов. ДНК с наибольшим числом повторов располагается в области центромеров. Число повторов может достигать 10^4. ДНК с умеренным числом повторов содержит гены, которые могут повторяться десятки и сотни раз. Уникальная ДНК содержит гены, которые либо вовсе не повторяются, либо повторяются всего несколько раз. Например, уникальными последовательностями в ДНК кодируются гены таких белков, как фиброин шелка, гемоглобин, овальбумин. Отличительной чертой ДНК эукариот является также то, что многие гены, кодирующие белки, имеют вставочные последовательности нуклеотидов.

Синтез РНК в эукариотических клетках осуществляется при посредстве РНК-полимераз трех типов. В *и*РНК транслируемая нуклеотидная последователь-

ность окаймлена с обеих сторон довольно длинными нетранслируемыми последовательностями. Дополнительно к другим факторам регуляции трансляция у эукариот регулируется набором протеинкиназ. В митохондриях и хлоропластах может находиться ДНК, не связанная с ядерной ДНК клетки. Эта ДНК лежит свободно, не образует комплексов с гистонами и используется для синтеза белка в органеллах наподобие синтеза белка в бактериальных клетках.

Синтез секреторных и мембранных белков в клетках эукариот осуществляется на рибосомах, которые ассоциированы в полирибосомные цепи, локализованные на мембранах эндоплазматической сети. Синтезируемый белок имеет сигнальную последовательность, которая необходима для прикрепления рибосомы к мембране эндоплазматической сети и отщепляется при прохождении полипептидной цепи через мембрану. К белкам, синтезированным на полисомах, прикрепленных к мембране ЭПС, присоединяются один или несколько углеводных остатков, образуя гликопротеин. Вновь образованные гликопротеины в составе окаймленных пузырьков переносятся из пространства эндоплазматической сети в цистерны аппарата Гольджи. Окаймленные пузырьки, по-видимому, являются универсальным средством обмена между мембранными структурами. В аппарате Гольджи происходит окончательная химическая обработка синтезированных гликопротеинов и сортировка их по назначению. Важную роль в этой сортировке играют углеводные остатки.

С понятием нуклеиновых кислот тесно связано функционирование *вирусов,* особенно *бактериофагов*, избирательно разрушающих бактериальные клетки. Механизм разрушающего действия бактериофагов заключается в том, что они могут включать свою ДНК в состав ДНК бактерии. После заражения бактерии бактериофагом события могут развиваться двумя путями. Во-первых, бактериофаг может размножаться в клетке, приводя к ее разрушению. Во-вторых, ДНК бактериофага может включаться в ДНК бактерии не размножаясь, а только заражая клетку. Следовательно, бактериофаги не всегда убивают клетку бактерии, а могут существовать в ней в скрытом состоянии. После попадания в клетку бактерии, ДНК бактериофага может либо встраиваться в ДНК бактерии, либо существовать в кольцевой форме. И в том, и в другом случаях фаговая ДНК может реплицироваться

для синтеза белков, необходимых для построения новых вирусов. Внедрение ДНК бактериофага в состав ДНК бактерии может происходить только в присутствии специфического белка. Вырезание ДНК бактериофага из состава ДНК бактерии происходит, если в дополнение к этому специфическому белку появляется другой специфический белок.

За счет проникновения нуклеиновых кислот в клетки эукариот некоторые РНК- и ДНК-содержащие вирусы могут вызывать *раковые заболевания*. К таким РНК-содержащим вирусам относится вирус саркомы Рауса. Этот вирус является онкогенным вирусом. Размножение онкогенных вирусных частиц в клетке происходит с помощью ДНК-посредника. Другие РНК-содержащие вирусы, не способные размножаться с помощью ДНК-посредника, рак не вызывают. К ДНК-содержащим онкогенным вирусам относятся, например, обезьяний вирус-40 и вирус полиомы. Интересно, что онкогенные вирусы, как РНК-, так и ДНК-содержащие, содержат всего четыре-пять генов. Считается, что в развитии злокачественной опухоли принимает участие всего один или два вирусных гена, которые называются онкогенами. После заражения онкогенными вирусами клеточные культуры резко меняют свои свойства: клетки начинают делиться непрерывно, отделяться от культуры и распространяться хаотически во всех направлениях. Геном клетки-хозяина содержит вирусоспецифическую ДНК, которая передается последующим поколениям клеток, т. е. наследуется. Поэтому свойства клеток, возникшие в результате проникновения вирусной нуклеиновой кислоты, сохраняются в потомстве и становятся наследуемым изменением фенотипа. Зараженные клетки культур навсегда сохранят приобретенные новые свойства. В некоторых случаях при введении таких клеток в соответствующий организм в нем развивается раковая опухоль.

Устойчивость клеток животных организмов к действию вирусов значительно усиливается в присутствии *интерферонов* — веществ, относящихся к короткоцепочечным полипептидам. Интерфероны в значительном количестве образуются в лейкоцитах животных. Образование интерферонов увеличивается в присутствии двухцепочечных молекул РНК. Механизм усиления способности клеток сопротивляться внедрению вирусов под действием интерферона обусловлен связыванием этого

белка с мембраной клетки. Клетки приобретают неспецифическую устойчивость к многим вирусам. Интерфероны обладают высокой активностью и действуют в очень небольших концентрациях. Интерферон увеличивает синтез трех ферментов: олигонуклеотид-синтетазы, эндонуклеазы и киназы. Эти ферменты на разных этапах блокируют синтез белка.

Большое значение в изменении генетического материала имеют перестройки генов: *рекомбинация, транспозиция* и *клонирование*. При этом происходит перемещение крупных участков ДНК. Генетическая рекомбинация заключается в том, что происходит разрыв ДНК с последующим воссоединением ее цепей. При этом возникает новая молекула ДНК, часть которой произошла от одной родительской молекулы ДНК, а часть — от другой. Генетическая рекомбинация характеризуется спариванием гомологичных цепей ДНК. При рекомбинации происходит перекрест двух цепей ДНК. Генетическая рекомбинация сопровождается образованием новых сочетаний аллелей и практически не затрагивает расположения локусов.

Важный фактор перестройки генома бактерий — наличие подвижных генетических элементов, в частности, *плазмид,* представляющих собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, в состав которых входит от двух до нескольких сотен тысяч пар азотистых оснований. Плазмиды представляют собой дополнительные гены в бактериальной клетке, ответственные за инактивацию некоторых антибиотиков, образование токсинов и утилизацию некоторых природных веществ. Отличительной особенностью плазмид является то, что при определенных условиях бактериальная клетка может существовать и без плазмид, а без основной ДНК бактериальная клетка существовать не может.

Достижения в изучении структуры, химии и биологии нуклеиновых кислот привели со временем к тому, что в лабораториях стали конструировать новые геномы, а затем и клонировать их в клетках животных. Возникло новое направление молекулярной биологии — технология рекомбинантных ДНК. Это направление дало возможность создавать в лабораторных условиях новые комбинации неродственных генов. После образования такой комбинации ее можно ввести в клетку, осуществить ее многократное считывание для получения нового синтетического продукта или многократное повторение

для размножения, используя механизм реализации генетической информации, существующий в клетке. Таким образом, возникает возможность транскрипции или трансляции новых генов, вводимых в клетку.

В клонировании ДНК можно выделить три этапа. Во-первых, это создание рекомбинантной молекулы ДНК. Во-вторых, введение рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина, которое может происходить либо спонтанно, либо с помощью вируса-носителя. В-третьих, отбор клеток, которые несут рекомбинантную ДНК. Такие клоны клеток отбирают по наличию признака присутствия ДНК-переносчика или самого гена. Другим способом определения является использование комплементарной РНК, которая специфически связывается с искомым геном.

Клоны клеток, содержащие рекомбинантную ДНК, стабильны при делении по крайней мере в течение нескольких сотен поколений.

Современные исследования рекомбинантных ДНК позволили расширить знания о строении хромосом, об экспрессии гена. Метод получения рекомбинантных ДНК в настоящее время внедряют для изучения сложных геномов их генов, путей регуляции экспрессии и последствий различных перестроек генетического материала. Так, для введения эукариотического гена в геном бактерий используют наиболее изученные бактерии кишечной палочки. При этом сохраняется способность к транскрипции эукариотического гена в бактериальных клетках, к экспрессии этого гена. Следовательно, в бактериях могут экспрессироваться и гены млекопитающих. Действительно, в бактериальных клетках кишечной палочки был экспрессирован ген инсулина крысы. ДНК гена инсулина вводят в геном бактерии после получения его с помощью обратной транскрипции *и*РНК клеток опухоли поджелудочной железы, выделяющих инсулин в больших количествах. Такой путь получения рекомбинантной ДНК связан с тем, что ген эукариотов содержит вставочные последовательности нуклеотидов, а в клетках бактерий нет механизма их удаления. Затем клетки с встроенным геном клонируют и получают продукт, который представляет собой чистый синтезированный бактериями путем транскрипции гена инсулин. Аналогично осуществлен синтез других эукариотических белков.

Какие перспективы открывает перед научным миром

клонирование генов? В молекулярной биологии с развитием метода рекомбинантных ДНК появились большие возможности. Получение в больших количествах однородной ДНК позволяет проводить многие ранее недоступные исследования. Изучаются участки ДНК, ответственные за специфические ее функции — репликацию и транскрипцию, нуклеотидная последовательность в ДНК. Результаты многочисленных экспериментов дают новые сведения о нуклеиновых кислотах, позволяют проводить картирование хромосом и манипулировать отдельными их участками. Клонирование генов имеет и большое прикладное значение, давая возможность синтезировать в больших количествах различные белки с высокой степенью химической чистоты, а также создавать сочетания неродственных генов. Образованные сочетания можно, как и единичные гены, клонировать в клетках-хозяевах.

Эта книга показывает сложность и вместе с тем перспективность изучения химии и биологии нуклеиновых кислот как для научных целей, так и в практическом приложении. Авторы надеются, что рассказ о современных методах изучения нуклеиновых кислот дает возможность углубить ваши знания не только о нуклеиновых кислотах, но и о многих других веществах и обменных процессах клетки, а также об общих закономерностях жизни.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

Адансон М. (1727—1806) — французский ботаник, член Французской академии наук (1759). Один из основоположников естественной системы растений. Один из пионеров применения математических методов в биологии.

Астбери У. (1898—1961) — английский кристаллограф. Образование получил в Кембриджском университете, работал в Университетском колледже, а затем в Королевском институте в Лондоне.

Баев А. А. (р. 1903) — советский биохимик, член-корреспондент АН СССР (1968). Окончил медицинский факультет Казанского университета (1927). Основные

труды Баева в области молекулярной биологии посвящены химическому строению и функционированию тРНК.

Белозерский А. Н. (1905—1972) — советский биохимик, академик (1962), вице-президент АН СССР (1971—1972). В 1927 г. окончил физико-математический факультет Среднеазиатского государственного университета. Автор свыше 200 научных работ.

Берг П. (р. 1926) — американский биохимик, окончил Пенсильванский университет (1948), работал в Стэнфордском университете (США). Лауреат Нобелевской премии (1980) за работы в области генной инженерии.

Бидл Д. У. (р. 1903) — американский генетик. В 1926 г. окончил университет Небраски, а затем Корнеллский университет. Лауреат Нобелевской премии по медицине (1958) совместно с Э. Тейтемом и Д. Ледербергом за исследования по генетике.

Блобел Г. (р. 1936) — американский биохимик. Окончил Тюбингенский университет (1960), с 1976 г. — профессор Рокфеллеровского университета. Известен работами по изучению механизмов биосинтеза белков.

Бойер Х. — американский исследователь, работал в Медицинской школе Калифорнийского университета в Сан-Франциско (США). Участвовал в изучении плазмид бактерий.

Браунли Д. — английский исследователь, работал в лаборатории молекулярной биологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже (Англия).

Бриджис К. (1889—1938) — американский биолог, член Национальной академии наук США. Работал в Шуйлейрс-Фолсе (штат Нью-Йорк). Окончил Колумбийский университет (1912).

Гриффит Ф. (р. 1904) — английский генетик и биохимик. Показал в 1928 г., что под действием живых капсулированных вирулентных пневмококков невирулентные пневмококки становятся вирулентными.

Давиденков С. Н. (1880—1961) — советский невропатолог, академик АМН СССР (1945). В 1904 г. окончил медицинский факультет Московского университета. С 1912 г. заведующий кафедрой нервных болезней Харьковского женского медицинского института.

Даун Л. (1828—1896) — английский врач, описал форму врожденного слабоумия с характерными физическими признаками: низким ростом, наличием складки кожи во внутреннем углу глазной щели, впоследствии названную в его честь синдромом Дауна.

Дубинин Н. П. (р. 1907) — советский генетик, член-корреспондент (1946), академик АН СССР (1966). В 1928 г. окончил МГУ. С 1932 г. работает в ряде научно-исследовательских учреждений АН СССР, с 1966 г. — директор Института общей генетики.

Жакоб Ф. (р. 1920) — французский биолог. Окончил медицинский факультет Парижского университета. В 1940—1944 гг. сражался в армии де Голля, был ранен и награжден крестом Освобождения. Лауреат Нобелевской премии (1965) совместно с А. Львовым и Ж. Моно.

Калькар Г. (р. 1908) — американский биохимик, член Национальной академии наук США, занимался вопросами окислительного фосфорилирования, одновременно и независимо от В. А. Белицера провел первое количественное изучение окислительного фосфорилирования (1937—1941).

Клайнфельтер Г. Ф. (р. 1912) — американский эндокринолог. В 1942 г. вместе с сотрудниками впервые описал заболевание, обусловленное нарушением числа половых хромосом и характеризующееся недоразвитием половых органов.

Кольцов Н. К. (1872—1940) — советский биолог, профессор (1903), член-корреспондент АН СССР (1915), академик ВАСХНИЛ (1935). В 1894 г. окончил естественное отделение Московского университета, затем был командирован за границу.

Корнберг А. (р. 1918) — американский биохимик, доктор медицины (1941), член Национальной академии наук США и Американской академии искусств и науки, лауреат Нобелевской премии (1959). Окончил Сити-колледж г. Нью-Йорка (1937) и Рочестерский университет (1941).

Костов Д. (р. 1897) — болгарский биолог, член Болгарской АН (1946) и Югославской академии наук и искусств (1948). Окончил университет в Галле в 1924 г. Работал в Институте генетики АН СССР (1932—1939).

Коэн С. — американский исследователь, работал в Медицинской школе Стэнфордского университета (США). Участвовал в изучении явления трансформации.

Крик Ф. (р. 1916) — английский физик, специалист в области молекулярной биологии, доктор философии (1954), член Лондонского королевского общества (1959), почетный член Академии наук и искусств США (1962).

Ледерберг Д. (р. 1925) — американский генетик и биохимик. Окончил Колумбийский университет (1944), продолжил образование в Йельском университете. Лауреат Нобелевской премии (1958) совместно с Д. Бидлом и Э. Татумом.

Лежен Ж. (р. 1926) — французский педиатр и генетик, доктор естественных наук (1961), профессор (1964), член Королевского медицинского общества Англии (1964), член Американской академии наук (1968).

Лисавенко М. А. (1897—1967) — советский растениевод и селекционер, академик ВАСХНИЛ (1956). Родился в с. Боготоле Красноярского края. Учился в Томском университете (1917—1919) и Московской сельскохозяйственной академии (1929—1931).

Льюис Э. — американский исследователь, сотрудник Калифорнийского технологического института (США). Разработал метод образования мутации у дрозофил.

Мак-Клинток Б. (р. 1902) — американский цитогенетик, член Национальной академии наук США. Окончила Бруклинский и Корнеллский университеты (1927), Лауреат Нобелевской премии (1983) по физиологии и медицине.

Меллер Г. (1890—1967) — американский генетик. В 1910 г. окончил Колумбийский университет. В 1915 г. защитил докторскую диссертацию. В 1933—1937 гг. сотрудник Института генетики АН СССР в Москве, куда был приглашен Н. И. Вавиловым. Лауреат Нобелевской премии (1946).

Мишер Ф. (1844—1895) — швейцарский врач, биохимик и физиолог. Окончил Базельский университет. В 1869 г. из ядер лейкоцитов выделил вещество, названное им нуклеином и установил его кислотные свойства.

Моно Ж. (р. 1910—1976) — французский биохимик и микробиолог. По окончании естественного факультета Парижского университета (1934) работал там же. С 1945 г. заведующий лабораторией физиологии микробов. Лауреат Нобелевской премии (1965) совместно с Ф. Жакобом и А. Львовым.

Морган Т. (1866—1945) — американский биолог, один из основоположников современной генетики, президент Национальной академии наук США (1927—1931), почетный член АН СССР (1932), лауреат Нобелевской премии (1933).

Надсон Г. А. (1867—1940) — советский микробиолог и ботаник, академик (1929), один из основоположников радиобиологии в СССР. В 1889 г. окончил естественное отделение Петербургского университета.

Нил Д. (р. 1915) — американский генетик, врач, член Национальной академии наук США (1963). В 1939 г. получил в Рочестерском университете степень доктора философии по генетике, в 1944 г. окончил там же медицинскую школу.

Ниренберг М. (р. 1927) — американский биохимик, член Национальной академии наук США (1967) и

Американской академии искусств и наук (1966). Лауреат Нобелевской премии (1968) совместно с Р. Холли и Х. Кораной.

Паладе Г. (иногда Пелейд Д.) (р. 1912) — американский биолог, по происхождению румын, член Национальной академии наук США, лауреат Нобелевской премии (1974). Окончил в 1935 г. медицинский факультет Бухарестского университета.

Пейнтер Т. (1889—1969) — американский зоолог и цитогенетик, член Национальной академии наук США. Работал в Салеме (штат Вирджиния). Окончил Йельский университет в Нью-Хейвене (1909).

Полинг Л. (р. 1901) — американский химик и физик, член Национальной академии наук США, иностранный член АН СССР (1958), лауреат Нобелевской премии по химии (1954), Нобелевской премии за мир (1962). Окончил в 1922 г. Орегонский колледж.

Робертс Р. — американский исследователь, сотрудник лаборатории Колд-Спринг-Харбор (США).

Сабатини Д. (р. 1931) — американский биохимик, образование получил в Аргентине, сотрудник Рокфеллеровского университета. Показал, что синтезированный в микросомах белок попадает внутрь эндоплазматической сети.

Серебровский А. С. (1892—1948) — советский биолог, один из основоположников генетики в СССР, член-корреспондент АН СССР (1933). Окончил Московский университет в 1914 г. С 1918 г. работал на птицеводческой станции.

Спирин А. С. (р. 1931) — советский биохимик, академик АН СССР (1970), лауреат Ленинской премии (1976). В 1954 г. окончил МГУ. С 1962 г. заведующий лабораторией Института биохимии АН СССР. С 1964 г. профессор кафедры биохимии растений МГУ.

Стертевант А. (1891—1970) — американский зоолог и генетик, сотрудник Калифорнийского технологического

института (США). Предложил метод построения генетических карт — последовательности генов в хромосомах.

Татум Э. (иногда Тейтем) (р. 1909) — американский биохимик и генетик, член Национальной академии наук США (1952). Окончил Висконсинский университет (1931). Лауреат Нобелевской премии (1958) совместно с Д. Бидлом и Д. Ледербергом.

Уилкинс М. (р. 1916) — английский биофизик, член Лондонского королевского общества (1959). Окончил Кембриджский университет, доктор философии (1940). Лауреат Нобелевской премии (1962) совместно с Ф. Криком и Д. Уотсоном.

Уотсон Д. (р. 1928) — американский биохимик, специалист в области молекулярной биологии, профессор, лауреат Нобелевской премии (1962). Окончил в 1947 г. Чикагский университет и аспирантуру университета штата Индиана.

Филиппов Г. С. — советский микробиолог. В 1925 г. совместно с Г. А. Надсоном открыл искусственный мутагенез у низших грибов под влиянием рентгеновских лучей.

Фриз де Г. (1848—1935) — голландский ботаник. Образование получил в Лейдене, Гейдельберге и Вюрцбурге. В 1878—1918 гг. профессор Амстердамского университета и директор ботанического сада.

Хеллинг Р. — американский исследователь, сотрудник Медицинской школы Калифорнийского университета в Сан-Франциско (США). Участвовал в изучении плазмид бактерий.

Холли Р. (р. 1922) — американский биохимик, член Национальной академии наук США, Американской академии искусств и наук, лауреат Нобелевской премии (1968). В 1942 г. окончил университет штата Иллинойс по специальности органическая химия.

Чанг Э. — американский исследователь, сотрудник Медицинской школы Стэнфордского университета (США). Участвовал в изучении явления трансформации.

Чаргафф Э. (р. 1905) — биохимик. По национальности австриец. С 1928 г. в США, в 1940 г. принял гражданство США. Член Национальной академии наук США (1965) и Американской академии искусств и наук (1961).

Шерешевский Н. А. (1885—1961) — советский терапевт и эндокринолог, доктор медицины (1914), профессор (1933). В 1911 г. окончил медицинский факультет Московского университета. В 1913—1915 гг. стажировался в Германии.

Эйвери О. (1877—1955) — американский биохимик и бактериолог, уроженец Канады, совместно с К. Мак-Леодом и М. Мак-Карти показал, что действующим началом при трансформации у бактерий является ДНК (1944).

СОДЕРЖАНИЕ

Учебное издание

ШЕРСТНЕВ МИХАИЛ ПАНТЕЛЕЕВИЧ
КОМАРОВ ОЛЕГ САМОЙЛОВИЧ

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Зав. редакцией *А. Н. Соколов*
Редактор *З. В. Ларкина*
Младший редактор *М. В. Зарвирова*
Художественный редактор *И. В. Короткова*
Художники *Э. А. Десятник, Т. Я. Демина*
Технические редакторы *Т. Е. Молозева, О. А. Булавченкова*
Корректор *О. В. Ивашкина*

ИБ № 11 725

Сдано в набор 17.05.89. Подписано к печати 20.10.89. Формат 84×108/32. Бум. типограф. № 2. Гарнит. Таймс. Печать высокая. Усл. печ. л. 8,4 + 0,84 вкл. Усл. кр.-отт. 12,18. Уч.-изд. л. 8,29 + 0,77 вкл. Тираж 112 000 экз. Заказ 322. Цена 45 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Просвещение» Государственного комитета РСФСР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 129846, Москва, 3-й проезд Марьиной рощи, 41.

Ярославский полиграфкомбинат Госкомпечати СССР. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

45 коп.



М.П.ШЕРСТНЕВ О.С.КОМАРОВ • Химия и биология нуклеиновых кислот